(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2008-538284
(P2008-538284A)
(43)公表日　平成20年10月23日(2008.10.23)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4B029
C12M 1/00	(2006.01)	C12N	15/00	F	4B063
A61K 39/39	(2006.01)	C12M	1/00	A	4C085
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	39/39		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 47 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-505567 (P2008-505567)
(86)(22)出願日　平成18年4月3日 (2006.4.3)
(85)翻訳文提出日　平成19年12月3日 (2007.12.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/013004
(87)国際公開番号　WO2006/108135
(87)国際公開日　平成18年10月12日 (2006.10.12)
(31)優先権主張番号　60/668,005
(32)優先日　平成17年4月4日 (2005.4.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　505060347
ベリデックス・エルエルシー
Ｖｅｒｉｄｅｘ，ＬＬＣ
アメリカ合衆国、０７０５９　ニュージャージー州、ウォレン、テクノロジー・ドライブ　３３
３３　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｄｒｉｖｅ，Ｗａｒｒｅｎ，ＮＪ　０７０５９，Ｕ．Ｓ．Ａ．

最終頁に続く

(54)【発明の名称】乳房の腫瘍のレーザーマイクロダイセクションおよびマイクロアレイ解析が、エストロゲン受容体に関係する遺伝子および経路を明らかにする

(57)【要約】
【課題】エストロゲン受容体の発現状態を決定する方法を提供する。
【解決手段】ＥＲ＋の腫瘍とＥＲ－腫瘍間で有意差のある発現をする、有意なｐ値の１４７の遺伝子および１１２の遺伝子が、ＬＣＭデータセットおよび組織塊データセットそれぞれから同定された。６１の遺伝子は共通のデータセットで見出され、さらに８５の遺伝子がＬＣＭデータセットに特有であり、５１の遺伝子が腫瘍塊データセットにのみ存在した。８５の遺伝子についての遺伝子オントロジーを用いた経路分析により、エンドサイトーシス、セラミド産生、Ｒａｓ／ＥＲＫ／Ａｒｋカスケード、およびＪＡＴ－ＳＴＡＴ経路に関与した遺伝子がＥＲに関係する役割を果たしていることが示唆された。ＬＣＭによって採取した腫瘍細胞の遺伝子プロファイリングは、上皮腫瘍細胞の研究および特徴付け、ならびにＥＲに関連するシグナル伝達経路の知見を得る上で特有のアプローチを提供する。
【選択図】図１

【特許請求の範囲】
【請求項１】
エストロゲン受容体の発現状態を決定する方法において、
ａ．　乳癌患者から腫瘍組織塊の試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルより高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、エストロゲン受容体の発現状態を示唆する、方法。
【請求項２】
エストロゲン受容体の発現状態を決定する方法において、
ａ．　乳癌患者から顕微鏡的に単離された腫瘍試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルより高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、エストロゲン受容体の発現状態を示唆する、方法。
【請求項３】
乳癌患者の治療プロトコルを決定する方法において、
ａ．　乳癌患者から腫瘍組織塊の試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルより高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、再発を防止するために推奨された処置の程度および種類を医師が決定できるように再発のリスクを十分に示唆する、方法。
【請求項４】
乳癌患者の治療プロトコルを決定する方法において、
ａ．　乳癌患者から顕微鏡的に単離した腫瘍試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、

ステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルより高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、再発を防止するために推奨された処置の程度および種類を医師が決定できるように再発のリスクを十分に示唆する、方法。
【請求項５】
乳癌患者を処置する方法において、
ａ．　乳癌患者から腫瘍組織塊の試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
ｃ．　前記患者がハイリスク患者である場合に、前記患者をアジュバント療法で処置するステップと、
を含む、方法。
【請求項６】
乳癌患者を処置する方法において、
ａ．　乳癌患者から顕微鏡的に単離した腫瘍試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表４に記載の遺伝子配列に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
ｃ．　前記患者がハイリスク患者である場合に、前記患者をアジュバント療法で処置するステップと、
を含む、方法。
【請求項７】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
前記試料が、原発腫瘍から得られる、方法。
【請求項８】
請求項１、３、または５に記載の方法において、
前記組織塊の標本が、生検、または外科標本から得られる、方法。
【請求項９】
請求項２、４、または６に記載の方法において、
前記顕微鏡による単離が、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによるものである、方法。
【請求項１０】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
前記試料に構造的に発現している少なくとも１つの遺伝子の前記発現レベルを測定するステップ、
をさらに含む、方法。
【請求項１１】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
特異性が、少なくともほぼ４０％である、方法。
【請求項１２】

請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
感度が、少なくともほぼ９０％である、方法。
【請求項１３】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
前記遺伝子の発現パターンが、再発患者を示唆する発現パターンと比較される、方法。
【請求項１４】
請求項１３に記載の方法において、
前記発現パターンの前記比較が、パターン認識法で行われる、方法。
【請求項１５】
請求項１４に記載の方法において、
前記パターン認識法が、コックスの比例ハザード解析の使用を含む、方法。
【請求項１６】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
前記所定のカットオフレベルが、正常組織または良性細胞と比較して、前記試料で少なくとも１．５倍の過剰または過小発現である、方法。
【請求項１７】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
前記所定のカットオフレベルが、正常組織または良性細胞と比較して、転移性の細胞を有する前記試料で、少なくとも統計学的に有意なｐ値の過剰または過小発現を有する、方法。
【請求項１８】
請求項１７に記載の方法において、
前記ｐ値が、０．０５未満である、方法。
【請求項１９】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
遺伝子発現が、マイクロアレイ、または遺伝子チップで測定される、方法。
【請求項２０】
請求項１９に記載の方法において、
前記マイクロアレイが、ｃＤＮＡアレイ、またはオリゴヌクレオチドアレイである、方法。
【請求項２１】
請求項２０に記載の方法において、
前記マイクロアレイまたは前記遺伝子チップが、１つ以上の内部コントロール試薬をさらに含む、方法。
【請求項２２】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
遺伝子発現が、前記試料から抽出したＲＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって行われる核酸増幅法で決定される、方法。
【請求項２３】
請求項２２に記載の方法において、
前記ＰＣＲが、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（ＲＴ－ＰＣＲ）である、方法。
【請求項２４】
請求項２３に記載の方法において、
前記ＲＴ－ＰＣＲが、１つ以上の内部コントロール試薬をさらに含む、方法。
【請求項２５】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
遺伝子発現が、前記遺伝子によってコードされる蛋白質を測定または検出することで検出される、方法。
【請求項２６】
請求項２５に記載の方法において、

前記蛋白質が、前記蛋白質に特異的な抗体で検出される、方法。
【請求項２７】
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法において、
遺伝子発現が、前記遺伝子の特性を測定することで検出される、方法。
【請求項２８】
請求項２７に記載の方法において、
測定される前記特性が、ＤＮＡの増幅、メチル化、突然変異、および対立遺伝子変異からなる群から選択される、方法。
【請求項２９】
構成物において、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号からなる群から選択される少なくとも一つのプローブセット、
を含む、構成物。
【請求項３０】
生体試料のエストロゲン受容体の発現状態を決定するためにアッセイを行うためのキットにおいて、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、それらの相補体、またはその一部を検出するための物質、
を含む、キット。
【請求項３１】
請求項３０に記載のキットにおいて、
前記配列番号が、表２および／または表３の配列番号である、キット。
【請求項３２】
請求項３０に記載のキットにおいて、
前記配列番号が、表２および／または表４に記載されている、キット。
【請求項３３】
請求項３０に記載のキットにおいて、
マイクロアレイ解析を行うための試薬、
をさらに含む、キット。
【請求項３４】
請求項３０に記載のキットにおいて、
媒体であって、この媒体を通して、前記核酸配列、それらの相補体、またはその一部がアッセイされる、媒体、
をさらに含む、キット。
【請求項３５】
乳癌の状態を判断するための物品において、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、それらの相補体、またはその一部を検出するための物質、
を含む、物品。
【請求項３６】
請求項３５に記載の物品において、
前記配列番号が、表２および／または表３の配列番号である、物品。
【請求項３７】
請求項３５に記載の物品において、
前記配列番号が、表２および／または表４に記載されている、物品。
【請求項３８】
請求項３５に記載の物品において、
マイクロアレイ解析を行うための試薬、

をさらに含む、物品。
【請求項３９】
請求項３５に記載の物品において、
媒体であって、この媒体を通して、前記核酸配列、それらの相補体、またはその一部がアッセイされる、媒体、
をさらに含む、物品。
【請求項４０】
マイクロアレイ、または遺伝子チップにおいて、
請求項１～６のいずれか１項に記載の方法を実施するための、マイクロアレイ、または遺伝子チップ。
【請求項４１】
請求項４０に記載のマイクロアレイにおいて、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、その相補体、またはその一部、
を含む、マイクロアレイ。
【請求項４２】
請求項４１に記載のマイクロアレイにおいて、
ｃＤＮＡアレイ、またはオリゴヌクレオチドアレイ、
を含む、マイクロアレイ。
【請求項４３】
請求項４１に記載のマイクロアレイにおいて、
１つ以上の内部コントロール試薬、
をさらに含む、マイクロアレイ。
【請求項４４】
診断／予後診断のポートフォリオにおいて、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、その相補体、またはその一部、
を含む、ポートフォリオ。
【発明の詳細な説明】
【開示の内容】
【０００１】
〔連邦政府による資金提供を受けた研究または開発の記載〕
本発明のためにいかなる政府資金も使用されていない。
【０００２】
〔配列表、またはコンピュータプログラムリストのコンパクトディスクによる付表の参照〕
「配列表（Sequence Listing）」の付表が明記される。
【０００３】
〔発明の背景〕
乳癌の約７０～８０％でエストロゲン受容体α（ＥＲα）が発現しており、エストロゲンはホルモン依存性腫瘍の発症と成長において重要な役割を果たしている。リンパ節転移、腫瘍サイズ、および組織学的悪性度と共に、ＥＲの状態は、乳癌の予後診断因子の１つであり、かつホルモン療法の指標として考えられている。乳癌は、米国の女性において最もよく診断される癌であり、癌による死亡の主な原因の第２位となっている。エストロゲンは、正常乳腺の成長と分化において重要な役割を果たすが、乳腺癌（breast carcinoma）の発症と進行にも同様の役割を果たしている。エストロゲンは、ＥＲαを通して遺伝子の発現を調節し、ＥＲαは全乳癌の約７０～８０％で発現している（パール（Parl）、２０００）。現在の臨床診療での、ＥＲの存在は、原発性もしくは再発性の乳癌患者に対し

て、ホルモン療法もしくはアロマターゼ阻害薬療法を選択する際のマーカーとなっている（モクベル（Mokbel）　２００３）。ＥＲは、リガンドが活性化する転写因子であり、複数の標的組織の成長、発達、および維持対するステロイドホルモンであるエストロゲンの多面発現効果を媒介することが、広範囲な研究によって説明された（モッグズ（Moggs）ら、２００１）。エストロゲン受容体が遺伝子発現の転写促進を媒介する機構は、複雑である。ホール（Hall）ら（２００１）は、以下の４つの経路をまとめた。すなわち、１）ＥＲＥコンセンサスＤＮＡ配列との相互作用を通してＥＲ複合体（ER complex）が遺伝子の転写を調節する、古典的なリガンド依存性経路、２）成長因子とそのチロシンキナーゼ受容体がＥＲを活性化し、エストロゲン非存在下でＥＲ標的遺伝子の発現量を増加させると思われる、リガンド非依存性経路、３）ＡＰ１、ＳＰ１、およびＣＲＥなどの非ＥＲＥ様プロモーター要素との相互作用を通してＥＲ複合体による遺伝子調節の誘導がなされる、ＤＮＡ結合非依存性経路、４）急速な組織反応を引き起こす推定上の膜関連結合部位（putative membrane-associated binding site）をエストロゲンが活性化する、細胞表面（非遺伝子的）シグナル伝達、の４つの経路である。しかしながら、下流の標的遺伝子に対するエストロゲンの効果の詳細、補因子の役割、および他のシグナル伝達経路の間のクロストークについては、依然として大部分は不明である。

【０００４】

遺伝子発現プロファイル技術は、研究者が腫瘍生物学の複雑な問題を扱うことを可能にしている。多くの研究によって、乳癌におけるＥＲの状態と関連する遺伝子発現の明瞭なパターンが示され、ＥＲシグナル伝達に関連する遺伝子群が同定された（国際公開ＷＯ２００４／０７９０１４号；ウェスト（West）ら、２００１；グラブバーガー（Gruvberger）ら、および２００１；ソティリオ（Sotiriou）ら、２００３）。しかしながら、ほとんどのデータは、癌細胞に加えて間質細胞、繊維芽細胞、およびリンパ球などの様々な細胞集団で構成される腫瘤から単離されたｍＲＮＡの発現に基づいていた。そのうえ、臨床標本に含まれる腫瘍細胞の割合は、それぞれ大きく異なっている。これらの問題は、上皮細胞上で特異的に発現するＥＲに関する遺伝子発現データを危ういものにする可能性がある。近年、組織学的に均質な細胞群を調達する技術であるレーザーキャプチャーマイクロダイセクション（ＬＣＭ）（エメルト‐バック（Emmert-Buck）ら、１９９６）は、ＤＮＡマイクロアレイ技術と組み合わせて様々な種類の腫瘍の研究に用いられて成功を収めており（ルオ（Luo）ら、１９９９；マツイ（Matsui）ら、２００３；イム（Yim）ら、２００３；およびナカムラ（Nakamura）ら、２００４）、この様々な種類の腫瘍は、腫瘍の進行と転移に関連して遺伝子が同定される乳癌を含む（マ（Ma）ら、２００２；セス（Seth）ら、２００３；およびニシダテ（Nishidate）ら、２００４）。

【０００５】

〔発明の概要〕

本発明は、乳癌患者から腫瘍組織塊試料（bulk tissue tumor sample）を得ることと、ｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号と一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号と一致するｐｓｉｄのプローブセット（probe sets psids）で認識されるｍＲＮＡをコードする遺伝子の試料中の発現レベルを測定することと、によって、エストロゲン受容体の発現状態を決定する方法を提供し、所定のカットオフレベルより高いまたは低い上記遺伝子発現レベルがエストロゲン受容体の発現状態を示唆している。

【０００６】

本発明は、乳癌患者から顕微鏡下で単離した腫瘍試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号と一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号と一致するｐｓｉｄのプローブセットで認識されるｍＲＮＡをコードしている遺伝子の試料中の発現レベルを測定することと、によって、エストロゲン受容体の発現状態を決定する方法を提供し、所定のカットオフレベルより高いまたは低い上記遺伝子発現レベルがエストロゲン受容体の発現状態を示唆している。

【０００７】

本発明は、乳癌患者から腫瘍組織塊試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表３に記載の

配列番号と一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号と一致するｐｓｉｄｓのプローブセットで認識されるｍＲＮＡをコードしている遺伝子の試料中の発現レベルを測定することと、によって、乳癌患者の治療プロトコルを決定する方法を提供し、所定のカットオフレベルより高いまたは低い上記遺伝子発現レベルが、再発を防止するために推奨された療法の程度および種類を医師が決定できるように、再発のリスクを十分に示唆している。

【０００８】

本発明は、乳癌患者から顕微鏡下で単離した腫瘍試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号と一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号と一致するｐｓｉｄのプローブセットで認識されるｍＲＮＡをコードしている遺伝子の試料中の発現レベルを測定することと、によって乳癌患者の治療プロトコルを決定する方法を提供し、所定のカットオフレベルより高いまたは低い上記遺伝子発現レベルが、再発を防止するために推奨された療法の程度および種類を医師が決定できるように、再発のリスクを十分に示唆している。

【０００９】

本発明は、乳癌患者から腫瘍組織塊試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号と一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号と一致するｐｓｉｄのプローブセットで認識されるｍＲＮＡをコードしている遺伝子の試料中の発現レベルを測定することと、患者がハイリスク患者である場合、アジュバント療法で患者を処置することと、によって乳癌患者を処置する方法を提供する。

【００１０】

本発明は、乳癌患者から顕微鏡下で単離した腫瘍試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号と一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号と一致するｐｓｉｄのプローブセットで認識されるｍＲＮＡをコードしている遺伝子の試料中の発現レベルを測定することと、患者がハイリスク患者である場合、アジュバント療法で患者を処置することと、によって乳癌患者を処置する方法を提供する。

【００１１】

本発明は、表２、表３、および／または表４に記載の配列番号の少なくとも１つのプローブセットを含む構成物を提供する。

【００１２】

本発明は、表２、表３、および／または表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、それらの相補体、またはその一部を検出するための物質を含む、生体試料のエストロゲン受容体の発現状態を決定するためにアッセイを行うためのキットを提供する。

【００１３】

本発明は、表２、表３、および／または表４に記載の配列番号と一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、それらの相補体、またはその一部を検出するための物質を含む、乳癌の状態を評価するための物品を提供する。

【００１４】

本発明は、本明細書に記載した方法のいずれか１つの方法を実行するためのマイクロアレイまたは遺伝子チップを提供する。

【００１５】

本発明は、表２、表３、および／または表４に記載の配列番号と一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、それらの相補体、またはその一部を含む、診断／予後診断のポートフォリオを提供する。

【００１６】

〔図面の簡潔な説明〕

図１は、腫瘍塊データセット（bulk tomor data set）とＬＣＭで得た試料データセットとの間で、２１の連続して発現したハウスキーピング遺伝子の発現強度を比較した図である。

図２は、ジーン・スプリング・ソフトウェア（Gene Spring software）を使用した、包括的遺伝子発現データの教師なし二次元階層型クラスタリング解析（unsupervised two-dimensional hierarchical clustering analysis）を示す図である。少なくとも２つの試料で「存在（present）」判定を有する遺伝子を含むように、フィルターがかけられた。横の各列は遺伝子を示し、縦の行は試料に相当する。赤色または緑色は、全試料にわたる遺伝子の平均的な発現より高いもしくはより低い転写レベルを示している。青色のバーはＬＣＭ試料のデータを示し、黄色のバーは腫瘍塊のデータを示す。リガンド結合アッセイで確認された患者のＥＲの状態を、ＥＲ＋の患者を濃い緑色のブロックとして、ＥＲ－の患者をライトグリーンのブロックとして示した。Ａ，Ｂ，Ｃ，およびＤのバーは、ＬＣＭと組織塊クラスターの主要なサブグループを示す。

【００１７】

図３は、ＥＲ＋サブグループとＥＲ－サブグループとの間で差動的に発現した遺伝子の遺伝子経路分析の図である。チップ上に少なくとも１０の遺伝子を有したカテゴリーを、次の経路分析に使用した。データ解析から選択された遺伝子リストを、ＧＯ生物学的過程（GO Biological Process）カテゴリーにマッピングした。その後、遺伝子の超幾何分布の確率をカテゴリー毎に計算した。０．０５未満のｐ値と、少なくとも２つの遺伝子とを有したカテゴリーを、選択した遺伝子リストにおける過剰表示（over-represented）とみなした。図３Ａは、以下の３つのカテゴリー、すなわち、ＬＣＭデータセットと腫瘍塊データセット両方に共通、ＬＣＭ試料データセットに特有、腫瘍塊データセットに特有、と命名した遺伝子数の円グラフを表す。図３Ｂは、共通の遺伝子リストで同定した経路を記載した図である。図３Ｃは、ＬＣＭデータセットに特有な遺伝子の有意な経路を示す。図３Ｄは、腫瘍塊データセットに特有の経路を表す。ｐ値は、バーの脇に示した。

【００１８】

〔詳細な説明〕

乳房の腫瘍におけるＥＲの状態と上皮細胞に関連する遺伝子と経路とを調べるために、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション（ＬＣＭ）技術を応用して２８人のリンパ節無症状の乳房腫瘍試料から上皮腫瘍細胞を採取した。このうち１７人の患者はＥＲ＋の腫瘍を有し、１１人の患者はＥＲ－の腫瘍を有していた。Affymetrix Hu133A Gene Chipを用いて遺伝子発現プロファイルを分析した。一方で、同じ２８人の患者の腫瘍塊から単離した全ＲＮＡを用いて、同様に遺伝子プロファイルも作成した。ＥＲ＋の腫瘍とＥＲ－の腫瘍との間で有意差のある発現を有する、有意なＰ値の１４６の遺伝子と１１２の遺伝子が、ＬＣＭデータセットと組織塊データセットそれぞれから確認された。６１の遺伝子は両方のデータセットに共通であることが分かったが、一方で８５の遺伝子はＬＣＭデータセットに特有であり、５１の遺伝子は腫瘍塊データセットにのみ存在した。８５の遺伝子についての遺伝子オントロジー（Gene Ontology）を用いた経路分析により、エンドサイトーシス、セラミド産生、Ｒａｓ／ＥＲＫ／Ａｒｋカスケード、およびＪＡＴ－ＳＴＡＴ経路に関与する遺伝子がＥＲと関連する役割を果たしている場合があることが示唆された。ＬＣＭによって採取された腫瘍細胞の遺伝子プロファイリングは、上皮腫瘍細胞を研究し、かつＥＲに関連するシグナル伝達経路の知見を得るために特有のアプローチを提供する。

【００１９】

本発明は、乳癌患者から腫瘍組織塊試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄのプローブセットによって認識されるｍＲＮＡをコードする遺伝子試料中の発現レベルを測定することと、によってエストロゲン受容体の発現状態を決定する方法を提供し、所定のカットオフレベルより高いもしくは低い遺伝子発現レベルが、エストロゲン受容体の発現状態を示している。

【００２０】

試料は生検もしくは外科標本などの原発腫瘍から得ることができる。この方法は、試料で構造的に発現している少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを測定することをさらに含

むこともできる。一実施形態では、この方法は、特異性が少なくとも約４０％であり、感度が少なくとも約９０％であるという結果をもたらす。他の実施形態では、遺伝子の発現パターンは、再発患者を示す発現パターンと比較される。発現パターンの比較は、コックス（Ｃｏｘ）の比例ハザード解析のようなパターン認識法によって行うことができる。

【００２１】

一実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞もしくは正常組織と比較して、試料では少なくとも１．５倍の過剰もしくは過小な発現である。他の実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞もしくは正常組織と比較して、転移性の細胞を有する試料では少なくとも統計的に有意なｐ値の過剰もしくは過小な発現を有する。ｐ値は０．０５未満であることが望ましい。

【００２２】

一実施形態では、遺伝子発現は、ｃＤＮＡアレイもしくはオリゴヌクレオチドアレイなどのマイクロアレイもしくは遺伝子チップで測定される。マイクロアレイもしくは遺伝子チップは、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬をさらに含むこともできる。一実施形態では、遺伝子発現は、試料から抽出されたＲＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって行われる核酸増幅によって決定される。ＰＣＲは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によることもでき、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬を含むこともできる。一実施形態では、蛋白質に特異的な抗体などの遺伝子がコードする蛋白質を測定もしくは検出することによって、遺伝子発現が検出される。一実施形態では、遺伝子発現は、ＤＮＡ増幅、メチル化、突然変異、および対立遺伝子変異（allelic variation）などの遺伝子の特徴を測定することによって検出される。

【００２３】

本発明は、乳癌患者から顕微鏡的に単離された腫瘍試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄのプローブセットによって認識されるｍＲＮＡをコードする遺伝子の試料の発現レベルを測定することと、によって、エストロゲン受容体の発現状態を決定する方法を提供し、所定のカットオフレベルより高いもしくは低い遺伝子発現レベルが、エストロゲン受容体の発現状態を示す。

【００２４】

試料は原発腫瘍から得ることができる。顕微鏡的な単離は、例えば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによって行うこともできる。この方法は試料で構造的に（constitutively）発現している少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを測定することをさらに含むこともできる。一実施形態では、この方法は、特異性が少なくとも約４０％であり、感度が少なくとも約９０％であるという結果をもたらす。他の実施形態では、遺伝子の発現パターンは、再発患者を示す発現パターンと比較される。発現パターンの比較は、Ｃｏｘの比例ハザード解析などのパターン認識法によって行うことができる。

【００２５】

一実施形態では、所定のカットオフレベルは、試料において良性細胞もしくは正常組織と比較して少なくとも１．５倍の過剰もしくは過小な発現である。他の実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞もしくは正常組織と比較して、転移性の細胞を有する試料では少なくとも統計的に有意なｐ値の過剰もしくは過小な発現を有する。ｐ値は０．０５未満であることが望ましい。

【００２６】

一実施形態では、遺伝子発現は、ｃＤＮＡアレイもしくはオリゴヌクレオチドアレイなどのマイクロアレイもしくは遺伝子チップで測定される。マイクロアレイもしくは遺伝子チップは、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬をさらに含むこともできる。一実施形態では、遺伝子発現は、試料から抽出されたＲＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって行われる核酸増幅によって決定される。ＰＣＲは逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によることもでき、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬を含むこともできる。一実施形態では、蛋白質に特異的な抗体などの遺伝子がコードする蛋

白質を測定もしくは検出することによって、遺伝子発現が検出される。一実施形態では、ＤＮＡ増幅、メチル化、突然変異、および対立遺伝子変異などの遺伝子の特徴を測定することによって、遺伝子発現が検出される。

【００２７】

本発明は、乳癌患者から腫瘍組織塊試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄのプローブセットによって認識されるｍＲＮＡをコードする遺伝子の試料の発現レベルを測定することと、によって乳癌患者の治療プロトコルを決定する方法を提供し、所定のカットオフレベルより高いもしくは低い遺伝子発現レベルが、再発の危険性を十分に示し、医師が再発を予防するために推奨される治療法の程度および種類を決定できるようにする。

【００２８】

試料は、生検もしくは外科標本などの原発腫瘍から得ることができる。この方法は、試料で構造的に発現している少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを測定することをさらに含むこともできる。一実施形態では、この方法は、特異性が少なくとも約４０％であり、感度が少なくとも約９０％であるという結果をもたらす。他の実施形態では、遺伝子の発現パターンは再発患者を示す発現パターンと比較される。発現パターンの比較は、Ｃｏｘの比例ハザード解析などのパターン認識法によって行うことができる。

【００２９】

一実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞あるいは正常組織と比較して、試料では少なくとも１．５倍の過剰もしくは過小な発現である。他の実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞もしくは正常組織と比較して、転移性の細胞を有する試料では少なくとも統計的に有意なｐ値の過剰もしくは過小な発現を有する。ｐ値は０．０５未満であることが望ましい。

【００３０】

一実施形態では、遺伝子発現は、ｃＤＮＡアレイもしくはオリゴヌクレオチドアレイなどのマイクロアレイもしくは遺伝子チップで測定される。マイクロアレイもしくは遺伝子チップは、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬をさらに含むこともできる。一実施形態では、遺伝子発現は、試料から抽出されたＲＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって行われる核酸増幅によって決定される。ＰＣＲは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によることもでき、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬を含むこともできる。一実施形態では、蛋白質に特異的な抗体などの遺伝子がコードする蛋白質を測定もしくは検出することによって、遺伝子発現が検出される。一実施形態では、遺伝子発現は、ＤＮＡ増幅、メチル化、突然変異、および対立遺伝子変異のような遺伝子の特徴を測定することによって検出される。

【００３１】

本発明は、乳癌患者から顕微鏡的に単離された腫瘍試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄのプローブセットによって認識されるｍＲＮＡをコードする遺伝子試料中の発現レベルを測定することとによって乳癌患者の治療プロトコルを決定する方法を提供し、所定のカットオフレベルより高いもしくは低い遺伝子発現レベルが、再発の危険性を十分に示し、医師が再発を予防するために推奨される治療法の程度および種類を決定できるようにする。

【００３２】

標本は原発腫瘍から得ることができる。顕微鏡的な単離は、例えば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによって行うこともできる。この方法は、試料で構造的に発現している少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを測定することをさらに含むこともできる。一実施形態では、この方法は、特異性が少なくとも約４０％であり、感度が少なくとも約９０％であるという結果をもたらす。他の実施形態では、遺伝子の発現パターンは、再発患者を示す発現パターンと比較される。発現パターンの比較は、Ｃｏｘの比例ハザー

ド解析などのパターン認識法によって行うことができる。

【００３３】

一実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞もしくは正常組織と比較して、試料では少なくとも１．５倍の過剰もしくは過小な発現である。他の実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞あるいは正常組織と比較して、転移性の細胞を有する試料では少なくとも統計的に有意なｐ値の過剰もしくは過小な発現を有する。ｐ値は０．０５未満であることが望ましい。

【００３４】

一実施形態では、遺伝子発現は、ｃＤＮＡアレイもしくはオリゴヌクレオチドアレイなどのマイクロアレイもしくは遺伝子チップで測定される。マイクロアレイもしくは遺伝子チップは、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬をさらに含むこともできる。一実施形態では、試料から抽出されたＲＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって行われる核酸増幅によって、遺伝子発現が決定される。ＰＣＲは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によることもでき、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬を含むこともできる。一実施形態では、蛋白質に特異的な抗体などの遺伝子がコードする蛋白質を測定もしくは検出することによって、遺伝子発現が検出される。一実施形態では、遺伝子発現は、ＤＮＡ増幅、メチル化、突然変異、および対立遺伝子変異などの遺伝子の特徴を測定することによって検出される。

【００３５】

本発明は、乳癌患者から腫瘍組織塊試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄのプローブセットによって認識されるｍＲＮＡをコードする遺伝子試料中の発現レベルを測定することと、ハイリスク患者の場合にはアジュバント療法によって処置することと、によって、乳癌患者を処置する方法を提供する。

【００３６】

試料は、生検あるいは外科標本などの原発腫瘍から得ることができる。この方法は、試料で構造的に発現している少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを測定することをさらに含むこともできる。一実施形態では、この方法は、特異性が少なくとも約４０％であり、感度が少なくとも約９０％であるという結果をもたらす。他の実施形態では、遺伝子の発現パターンは、再発患者を示す発現パターンと比較される。発現パターンの比較は、Ｃｏｘの比例ハザード解析のようなパターン認識法によって行うことができる。

【００３７】

一実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞あるいは正常組織と比較して、試料では少なくとも１．５倍の過剰あるいは過小な発現である。他の実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞あるいは正常組織と比較して、転移性の細胞を有する試料では少なくとも統計的に有意なｐ値の過剰あるいは過小な発現を有する。ｐ値は０．０５未満であることが望ましい。

【００３８】

一実施形態では、遺伝子発現は、ｃＤＮＡアレイもしくはオリゴヌクレオチドアレイなどのマイクロアレイもしくは遺伝子チップで測定される。マイクロアレイもしくは遺伝子チップは、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬をさらに含むこともできる。一実施形態では、試料から抽出されたＲＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって行われる核酸増幅によって、遺伝子発現が決定される。ＰＣＲは逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によることもでき、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬を含むこともできる。一実施形態では、蛋白質に特異的な抗体などの遺伝子がコードする蛋白質を測定もしくは検出することによって、遺伝子発現が検出される。一実施形態では、ＤＮＡ増幅、メチル化、突然変異、および対立遺伝子変異などの遺伝子の特徴を測定することによって、遺伝子発現が検出される。

【００３９】

本発明は、乳癌患者から顕微鏡的に単離された試料を得ることと、ｉ．表２もしくは表

４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡ、またはｉｉ．表もしくは表４に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄのプローブセットによって認識されるｍＲＮＡをコードする遺伝子の試料中の発現レベルを測定することと、ハイリスク患者の場合にはアジュバント療法によって処置を行うことと、によって、乳癌患者を処置する方法を提供する。

【００４０】

試料は原発腫瘍から得ることができる。顕微鏡的な単離は、例えば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによって行うこともできる。この方法は、試料で構造的に発現している少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを測定することをさらに含むこともできる。一実施形態では、この方法は、特異性が少なくとも約４０％であり、また感度が少なくとも９０％であるという結果をもたらす。他の実施形態では、遺伝子の発現パターンは、再発患者を示す発現パターンと比較される。発現パターンの比較は、Ｃｏｘの比例ハザード解析のようなパターン認識法によって行うこともできる。

【００４１】

一実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞もしくは正常組織と比較して、試料では少なくとも１．５倍の過剰あるいは過小な発現である。他の実施形態では、所定のカットオフレベルは、良性細胞もしくは正常組織と比較して、転移性の細胞を有する試料では少なくとも統計的に有意なｐ値の過剰もしくは過小な発現を有する。ｐ値は０．０５未満であることが望ましい。

【００４２】

一実施形態では、遺伝子発現は、ｃＤＮＡアレイもしくはオリゴヌクレオチドアレイなどのマイクロアレイもしくは遺伝子チップで測定される。マイクロアレイもしくは遺伝子チップは、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬をさらに含むこともできる。一実施形態では、遺伝子発現は、試料から抽出されたＲＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって行われる核酸増幅によって決定される。ＰＣＲは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によることもでき、１つもしくはそれ以上の内部コントロール試薬を含むこともできる。一実施形態では、蛋白質に特異的な抗体などの遺伝子がコードする蛋白質を測定あるいは検出することによって、遺伝子発現が検出される。一実施形態では、遺伝子発現は、ＤＮＡ増幅、メチル化、突然変異、および対立遺伝子変異などの遺伝子の特徴を測定することによって検出される。

【００４３】

本発明は、キット、物品、マイクロアレイなど、表２、表３、および／もしくは表４に記載の配列番号の少なくとも１つのプローブセットを具備する構成物を提供する。

【００４４】

本発明は、表２、表３、および／もしくは表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子の組み合わせの、単離された核酸配列、それらの相補体、もしくはその一部分を検出するための物質を含む、生体試料のエストロゲン受容体の発現状態を決定するためにアッセイを行うキットを提供する。一実施形態では、配列番号は表２、および／もしくは表３の配列番号である。他の実施形態では、配列番号は表２、および／もしくは表４に記載されている。上記キットは、媒体であって、該核酸配列、それらの相補体、もしくはその一部がアッセイされる媒体など、マイクロアレイ解析を行うための試薬をさらに含むこともできる。

【００４５】

本発明は、表２、表３、および／もしくは表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子の組み合わせの、単離された核酸配列、それらの相補体、もしくはその一部を検出するための物質を含む、乳癌の状態を評価する物品を提供する。一実施形態では、配列番号は表２および／もしくは表３の配列番号である。他の実施形態では、配列番号は表２および／もしくは表４に記載されている。この物品は、媒体であって、上記の核酸配列、それらの相補体、もしくはその一部がアッセイされる媒体など、マイクロアレイ解析を行うための試薬をさらに含むこともできる。

【００４６】

本発明は、本明細書に記載された方法のうち任意の１つの方法を実施するためのマイクロアレイもしくは遺伝子チップを提供する。マイクロアレイは、表２、表３、および／もしくは表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子の組み合わせの、単離された核酸配列、それらの相補体、もしくはその一部を含むことができる。マイクロアレイは、ｃＤＮＡアレイもしくはオリゴヌクレオチドアレイをさらに含むこともできる。マイクロアレイは、１つあるいはそれ以上の内部コントロール試薬をさらに含むこともできる。

【００４７】

本発明は、表２、表３、および／もしくは表４に記載された配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子の組み合わせの、単離された核酸配列、それらの相補体、もしくはその一部を含む、診断／予後判断のポートフォリオを提供する。

【００４８】

顕微鏡的に単離された乳房腫瘍細胞を使用した遺伝子発現プロファイリングは、異なって発現したＥＲの状態に関連する遺伝子を同定するのみではなく、エストロゲンシグナル伝達と関連する経路に関する新たな情報も提供する。これらの遺伝子の機能的および臨床的重要性を解明することは、腫瘍の進行もしくはステージと、同定された遺伝子の発現レベルを相互に関係させることによって乳房腫瘍の発症を確定することにも有用である。乳房の上皮細胞特異的な遺伝子を同定することは、組織中あるいは生体内の発現システムの中で、薬剤あるいは他の物質の存在に応答する同定された遺伝子の発現レベルを監視することによって、乳癌に対する創薬（drug discovery）においてさらに利点を提供する。

【００４９】

単に、組織試料での特定の核酸配列のささいな存在（mere presence）もしくは非存在が、臨床的もしくは予後診断的な価値を有することがきわめてまれに認められている。一方では、各種蛋白質、ペプチドもしくはｍＲＮＡの発現についての情報は、ますます重要なものと見られている。ゲノム内の、蛋白質、ペプチド、あるいはｍＲＮＡを発現する可能性を有する核酸配列（「遺伝子（genes）」と呼ばれるような配列）の単なる存在は単独で、所定の細胞内で蛋白質、ペプチド、もしくはｍＲＮＡが発現するかどうかの確定要素とはならない。所定の遺伝子が蛋白質、ペプチド、もしくはｍＲＮＡを発現する能力があるか否かも同様であるし、たとえ発現したとしても、どの程度発現するかは様々な複合因子によって決定される。これらの要因の理解および評価の困難とは関係なく、遺伝子発現を解析することは、腫瘍形成、転移、アポトーシスおよび他の臨床的に関連のある現象のような重要な事象の発生に関して有用な情報を提供することができる。遺伝子がどの程度活性もしくは不活性であるかの相対的な指標は、遺伝子発現プロファイルで見出すことができる。本発明における遺伝子発現プロファイルは、乳癌患者の予後診断を行い、かつ乳癌患者を治療するために使用される。

【００５０】

試料の準備として、患者の試料を収集する必要がある。本発明の方法に使用する患者試料は、乳房の試料の原発腫瘍から採取された上皮細胞など、病変した細胞を含むことが疑わしいものである。切除縁（surgical margins）から採取された試料も好ましい。しかしながら、最も好ましくは、試料は、乳癌の外科手術から得られたリンパ節から採取される。レーザーキャプチャーマイクロダイセクション（ＬＣＭ）技術は、研究されるべき細胞を選別するための１つの方法であり、細胞種の不均一性に起因する変動を最小化する。この結果、正常細胞と癌細胞との間の遺伝子発現の緩慢もしくは小さな違いを、容易に検出することができる。試料は末梢血から取り出された、循環している上皮細胞（circulating epithelial cells）を含むこともできる。上記の試料は多くの方法によって得ることができるが、最も好ましい方法は、米国特許第６，１３６，１８２号に開示された磁気的分離技術である。目的の細胞を含む試料が得られれば、ＲＮＡを抽出し、増幅し、適切なポートフォリオの遺伝子について、好ましくはマイクロアレイにより、遺伝子発現プロファイルを得る。

【００５１】

遺伝子発現プロファイルを確立するための好適な方法には、蛋白質もしくはペプチドをコードできる遺伝子によって産生されたＲＮＡの量を決定することが含まれる。これは、ＲＴ－ＰＣＲ法、競合ＲＴ－ＰＣＲ法、リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法、ディファレンシャルディスプレイＲＴ－ＰＣＲ法、ノーザンブロット解析、および他の関連する試験法により達成される。それぞれのＰＣＲ反応を使用してこれらの技術を実施することが可能である一方で、ｍＲＮＡから産生された相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）もしくは相補的ＲＮＡ（ｃＲＮＡ）を増幅して、マイクロアレイによって解析することが最良である。多数の各種アレイの構成、およびそれらを製造する方法は、当業者には既知であり、米国特許第５，４４５，９３４号；　第５，５３２，１２８号；　第５，５５６，７５２号；　第５，２４２，９７４号；　第５，３８４，２６１号；　第５，４０５，７８３号；　第５，４１２，０８７号；　第５，４２４，１８６号；　第５，４２９，８０７号；　第５，４３６，３２７号；　第５，４７２，６７２号；　第５，５２７，６８１号；　第５，５２９，７５６号；　第５，５４５，５３１号；　第５，５５４，５０１号；　第５，５６１，０７１号；　第５，５７１，６３９号；　第５，５９３，８３９号；　第５，５９９，６９５号；　第５，６２４，７１１号；　第５，６５８，７３４号；　および第５，７００，６３７号などの米国特許に記載されている。

【００５２】

マイクロアレイ技術は、何千もの遺伝子の定常状態のｍＲＮＡレベルを同時に測定することを可能にし、それによって、制御されていない細胞増殖の開始、停止、もしくは調整などの作用を同定するための強力なツールを提供する。２種類のマイクロアレイ技術が現在広く使用されている。第１の技術はｃＤＮＡアレイであり、第２の技術はオリゴヌクレオチドアレイである。これらのアレイのチップ構成には相異が存在するが、本質的には下流のデータ解析と出力は全て同じである。これらの解析から得られる物は、通常ではマイクロアレイの既知の位置に核酸配列をハイブリダイズする試料中の、ｃＤＮＡ配列を検出するために使用される、標識されたプローブから受け取る信号強度の測定である。通常は、シグナルの強度は、試料細胞で発現されたｃＤＮＡの量、したがってｍＲＮＡの量に比例する。このような多くの技術は入手可能であり有用である。遺伝子発現を確認するための好適な方法は、米国特許第６，００４，７５５号；　第６，２１８，１１４号；　第６，２１８，１２２号；および第６，２７１，００２号に記載されている。

【００５３】

発現レベルの解析は、シグナル強度の比較によってなされる。これは、試験試料の遺伝子発現強度の、対照試料の発現強度に対する、マトリクスの比を求めることによって最良に行われる。例えば、病変組織から得られた遺伝子発現強度を、同種の正常組織から得られた発現強度と比較することができる（例：病変乳房組織試料　対　正常乳房組織試料）。これらの発現強度の比は、試験試料と対照試料との間の遺伝子発現の倍率変化（fold-change）を示している。

【００５４】

遺伝子発現プロファイルも多くの方法で表示することができる。最も一般的な方法は、未加工の蛍光強度もしくはマトリクスの比を、縦の列が試験試料を示し、横の行が遺伝子を示す、グラフの樹状図（graphical Dendogram）に配列する方法である。データは、類似した発現プロファイルを有する遺伝子がお互いに近位になるように配列される。個々の遺伝子の発現比は、カラーで視覚化される。例えば、１未満の比（ダウンレギュレーションを示す）はスペクトルの青の部分に現れてよく、１より大きい比（アップレギュレーションを示す）はスペクトルの赤の部分の色として現れてよい。アジレント・テクノロジーズ社（Agilent Technologies）のGeneSpring、ならびにパーテック社（Partek）（登録商標）のPartek Discover（商標）、およびPartek Infer（商標）を含む、市販のコンピュータソフトウェアプログラムは、このようなデータを表示するために使用できる。

【００５５】

本発明の方法で使用された変調された遺伝子は、実施例の中に記載する。異なって発現した遺伝子は、再発していない患者に対し、乳癌の再発のある患者ではダウンレギュレー

トもしくはアップレギュレートされている。アップレギュレーションおよびダウンレギュレーションは、ある基準と比較して発現量に検出可能な差異がみられる（測定に使用した系のノイズの寄与を超える）ということを意味する相対的な用語である。この場合には、基準は再発していない患者の測定された遺伝子発現である。病変した細胞（再発患者の）の目的の遺伝子は、次に、同様の測定方法を使用して、基準値に対してアップレギュレートもしくはダウンレギュレートされる。この文脈において病変（diseased）とは、身体機能の適切な性能を、妨害するもしくは支障をきたす、または支障をきたす可能性がある、身体状態の変化のことを言い、それは制御されていない細胞増殖によって生じる。ある人について、その人の遺伝子型もしくは表現型が疾患の存在と矛盾しない場合に、病気であると診断される。しかしながら、診断や予後診断を行うという行為は、再発の可能性の決定や治療観察といった病気と状態の問題の決定を含んでいる。治療観察においては、遺伝子発現プロファイルが正常組織とより一致するパターンに変化したのかどうか、もしくは変化しつつあるのかどうかということを決定するために、何度も遺伝子発現の比較をして、所定の一連の治療の効果についての臨床的判断が行われる。

【００５６】

アップレギュレーションおよびダウンレギュレーションのレベルは、ハイブリダイズしたマイクロアレイプローブの強度測定の倍率変化に基づいて区別されることが望ましい。２．０倍の違いは、このような区別を行うのに望ましい（あるいはｐ値が０．０５未満）。すなわち、遺伝子が正常／非再発細胞に対して病変／再発細胞において異なって発現していると結論する前に、病変細胞は正常細胞と比較して少なくとも２倍より多い、もしくは２倍少ない強度をもたらすことが分かっている。より大きい倍率の差があるほど、診断もしくは予後判断の道具として遺伝子を使用することが好ましい。本発明の遺伝子発現プロファイルのために選択された遺伝子は、臨床用実験器具を使用してバックグラウンドノイズを超える量だけ、正常な遺伝子もしくは非変調遺伝子のシグナルと区別可能なシグナルを結果として発生する発現レベルを有している。

【００５７】

変調された遺伝子を、非変調遺伝子およびノイズと確信を持って区別するために統計的値を使用することもできる。統計的検定により、試料の様々な群の間で最も優位差のある遺伝子を検出する。スチューデントのｔ－検定は、ロバストな統計的検定の１例であり、２群間の有意差を検出するために使用することができる。ｐ値が低いほど、その遺伝子が異なる群の間の差を示している証拠がより説得力を持つ。とはいえ、マイクロアレイは、１回に２つ以上の遺伝子を測定するので、数万もの統計的検定を一度に行うことがあるかもしれない。このため、全くの偶然によって低いｐ値を見出す可能性は低く、シダックの補正のみでなくランダム化／置換を用いることでこの調整を行うことができる。ｔ－検定による０．０５未満のｐ値は、遺伝子に有意差があるという証拠となる。シダックの補正を計算に入れた後の０．０５未満のｐ値は、より強力な証拠となる。各群の多数の試料に対して、ランダム化／置換検定を行った後の０．０５未満のｐ値は、有意差を示す最も強力な証拠となる。

【００５８】

非変調遺伝子もしくはノイズのシグナルよりも強いシグナルを発する遺伝子を選択するために使用可能なもう１つのパラメータは、シグナルの絶対的な差の測定を利用することである。好ましくは、変調した遺伝子の発現によって発生するシグナルは、（絶対値で）正常もしくは非変調の遺伝子によるシグナルと少なくとも２０％差がある。さらに好ましくは、このような遺伝子が正常もしくは非変調の遺伝子の発現パターンと、少なくとも３０％異なった発現パターンを示す。

【００５９】

遺伝子は、グループ化して、グループ内の遺伝子のセットについて得られる情報が、診断、予後診断、もしくは処置法の選択などの臨床的に適切な判断を行う際の妥当な根拠を提供するようにすることもできる。これらの遺伝子のセットは、本発明のポートフォリオを作っている。この場合、このポートフォリオによってサポートされた判断は、乳癌およ

びその再発の可能性が含まれる。ほとんどの診断用マーカーと同様に、正確な医療的判断を行うのに十分な最小数のマーカーを使用することがしばしば望まれる。このことは、時間と資源の不適切な使用を防止するとともに、さらなる解析を待つ間の処置の遅延を防止する。

【００６０】

好ましくは、ポートフォリオは、そのポートフォリオ中の遺伝子の組み合わせによって、個々の遺伝子もしくはランダムに選択された遺伝子の組み合わせと比べて、向上した感度と特異性を示すように構築される。本明細書中では、ポートフォリオの感度は、正常状態と比較して病変状態での遺伝子の発現によって示される倍率の差に反映されうる。特異性は、遺伝子発現のシグナル伝達の、目的とする状態との相関の統計的測定に反映されうる。例えば、標準偏差はこのような測定として使用することができる。ポートフォリオに包含する遺伝子群を考えたとき、発現の測定値における小さな標準偏差は、より大きな特異性と相互に関係している。相関係数など変化の他の測定値も使用することが可能である。

【００６１】

遺伝子発現ポートフォリオを構築する１方法は、株式ポートフォリオを構築する際に広く使用されている平均分散アルゴリズムなど最適化アルゴリズムの使用によるものである。本方法は米国特許広報番号２００３０１９４７３４に詳細に記載されている。本質的には、この方法は返り値（return）（例：発生した信号）の変動を最小化し、使用するために、受け取る返り値を最適化する入力のセット（金融応用では株であるが、ここでは強度によって測定される発現である）の構築を必要とする。このような作業を行うための多くの市販のソフトウェアプログラムが入手可能である。好ましくは、本明細書では「ワグナーソフトウェア（Wagner Software）」と言われる「ワグナーアソシエイツ平均分散最適化アプリケーション（Wagner Associates Mean-Variance Optimization Application）」が好ましい。このソフトウェアは、「ワグナーアソシエイツ平均分散最適化ライブラリー（Wagner Associates Mean-Variance Optimization Library）」からの機能を用いて有効フロンティアを決定し、マーコウィッツの観念（Markowitz sense）における最適ポートフォリオが好ましい。この形式のソフトウェアを使用する際には、このソフトウェアが、意図された経済分析の目的で使用される際に株の収益とリスクの大きさ（stock return and risk measurements）が使用されるような形で、マイクロアレイのデータを入力として扱うことのできるように変形することが要求される。

【００６２】

ポートフォリオを選択する過程はまた、発見的規則の適用を含んでもよい。好ましくは、このような規則は、臨床的な結果を生み出すために使用される技術の理解および生物学に基づいて構築される。さらに好ましくは、このような規則が、最適化法から得られた出力に適用される。例えば、ポートフォリオ選択の平均分散法は、乳癌の被験者で異なって発現した多数の遺伝子に対するマイクロアレイデータに適用することができる。本方法の出力は、病変組織、ならびに末梢血に発現したいくつかの遺伝子を含むことができる、最適化された遺伝子のセットと推測される。もしこの検定法で使用される試料が末梢血から得られたものであり、乳癌の事例で異なって発現している特定の遺伝子が、末梢血中で異なって発現していた場合、ポートフォリオが、末梢血中で異なって発現しているものを排除する有効フロンティアから選択される、発見的規則を適用することが可能である。もちろん、例えばデータの事前選択の段階で規則を適用することにより、規則は有効フロンティアを形成する前に適用することもできる。

【００６３】

問題としている生物学とは必ずしも関連の無い他の発見的規則を適用することも可能である。例えば、ポートフォリオの所定のパーセンテージだけを、特定の遺伝子もしくは遺伝子群によって表わすことができる規則を適用することが可能である。ワグナーソフトウェアなどの市販ソフトウェアは、これらのタイプの発見的方法に容易に対応する。例えば、正確度と精密度以外の要素（例：予想されるライセンス料）が、１つ以上の遺伝子を含

める好ましさに影響を与えるときにこれは有用でありうる。

【００６４】

本発明の１方法では、予後判断に帰する様々な遺伝子（あるいはポートフォリオ）に対して遺伝子発現プロファイルと比較することを含む。ポートフォリオを含むそれぞれの遺伝子の遺伝子発現プロファイルは、コンピュータで読み込み可能な媒体などの媒体に記録される。これは様々な形態を取ってもよい。例えば、疾病を表わすシグナルの範囲（例：強度測定）を入力する表を確立してもよい。次に、患者の試料が正常か病変かを決定するために、実際の患者のデータを上記表の値と比較してもよい。より高度な実施形態においては、発現シグナル（例：蛍光強度）のパターンはデジタル的にあるいは図示的に記録される。

【００６５】

次に患者の試料と組み合わせて使用される遺伝子ポートフォリオからの遺伝子発現パターンを、発現パターンと比較する。次に患者の試料が疾病の再発を示すパターンを有するかどうかを決定するために、パターン比較ソフトウェアを使用することができる。もちろん、これらの比較は、患者が病気を再発する可能性が無いかどうか決定するためにも使用することができる。次に試料の発現プロファイルを対照細胞のポートフォリオと比較する。もし試料の発現パターンが乳癌の再発の発現パターンと一致すれば、（対抗するような医学的考察が無い場合には）患者は再発患者が受けるであろう処置と同様の治療を受ける。もし試料の発現パターンが正常／対照細胞の発現パターンと一致すれば、患者は乳癌に関して陰性と診断される。

【００６６】

本発明では、乳癌の予後診断を決定するために患者の遺伝子発現パターンを解析する最も好ましい方法は、Ｃｏｘのハザード解析プログラムを使用して行われる。最も好ましくは、解析はＳ－プラスソフトウェア（S-Plus software）（インサイトフル・コーポレーション（Insightful Corporation）から市販されている）を用いて行われる。このような方法を使用して、遺伝子発現プロファイルが確実に再発を示すプロファイルと比較される（つまりプロファイル中の遺伝子の組み合わせの発現レベルが再発を示している）。すでに閾値の決定されたＣｏｘのハザードモデルを、２つのプロファイル（既知の再発　対　患者）の類似性の比較に使用し、その後患者のプロファイルが閾値を超えているかどうか決定される。もし超えていれば、患者は将来再発するであろう患者として分類され、アジュバント療法などの治療を認められる。もし患者のプロファイルが閾値を超えていなければ、非再発性の患者として分類される。線形判別分析・ロジスティック回帰およびニューラルネットワークアプローチなどの他の解析ツールも、同様の疑問に答えるために使用することができる。

【００６７】

様々な他の周知のパターン認識方法も利用可能である。以下の参考文献ではいくつかの例を提供する。加重投票（Weighted Voting）（ゴルブ（Golub）ら、１９９９）、サポートベクターマシン（Support Vector Machines）（スー（Su）ら、２００１、およびラマズワミー（Ramaswamy）ら、２００１）、ｋ最近傍法（K-nearest Neighbors）（ラマズワミー（Ramaswamy）ら、２００１）、ならびに相関係数（ヴァンヴィール（van’t Veer）ら、２００２）。

【００６８】

本発明における遺伝子発現プロファイルは、癌の診断、予後判断、もしくは処置の観察に有用な、他の非遺伝子的な診断方法と組み合わせて使用することもできる。例えば、ある状況においては、上記に記載した遺伝子発現に基づく方法の診断力と、血清タンパクマーカー（例：癌抗原、２７．２９（「ＣＡ２７．２９」））などの従来のマーカーのデータとを組み合わせることは有益である。ＣＡ２７．２９のような分析物を含む、このような一連のマーカーが存在する。このような一方法では、治療中の患者から定期的に血液を採取し、その血液は、上記に記載した血清マーカーのうち１つについて酵素免疫測定を受ける。マーカー濃度が腫瘍の再発あるいは治療の失敗を示唆したときには、遺伝子発現解

析に従う試料源が採取される。疑わしい塊（mass）が存在する場所に、穿刺吸引（ＦＮＡ）を行い、その塊から採取された細胞の遺伝子発現プロファイルを上記に記載したように解析する。代わりに、以前に腫瘍が切除された組織に隣接する部位から組織試料を採取してもよい。このアプローチは、他の試験があいまいな結果を示すときに特に有効でありうる。

【００６９】

本発明の物品は、病気の処置、診断、予後判断、およびその他には病気の評価に有用な遺伝子発現プロファイルの表現を含む。これらのプロファイルの表現は、コンピュータで読み込むことのできる媒体（磁気的、光学的、および同等のもの）のような装置によって自動的に読むことのできる媒体に記録される。物品は、そのような媒体の遺伝子発現プロファイルを評価する取扱説明書も含むことができる。例えば、物品は、上記に記載された遺伝子のポートフォリオの遺伝子発現プロファイルを比較するためのコンピュータ取扱説明書を有するＣＤ　ＲＯＭを含んでもよい。物品はまた、患者試料から得られた遺伝子発現データと比較できるように、デジタル的に記録された遺伝子発現プロファイルを有してもよい。代わりに、上記プロファイルは、異なった表示形式で記録することもできる。図表記録は１つのそのような形式である。上記に記載した、パーテック社（Partek）（登録商標）のPartek Discover（商標）およびPartek Infer（商標）ソフトウェアに組み込まれたアルゴリズムなどのクラスタリングアルゴリズムは、そのようなデータの視覚化の際に最も役に立つであろう。

【００７０】

本発明に従った、異なったタイプの製造品は、遺伝子発現プロファイルを明らかにするために使用される媒体もしくはフォーマットされたアッセイ（formatted assay）である。これらは例えば、目的とする遺伝子を示す配列が結合し、それらの存在の読み出し可能な決定因子を作成するマトリクスに、配列相補体あるいはプローブが固定されたマイクロアレイを含むことができる。代替として、本発明に基づく物品は、乳癌を検出するために、ハイブリダイゼーション、増幅、および目的とする遺伝子の発現レベルを示すシグナル発生を行うための試薬キットに作り上げられることができる。

【００７１】

本発明に従って作製されたキットは、遺伝子発現プロファイルを決定するためのフォーマットされたアッセイを含む。上記キットには、試薬や取扱説明書など、アッセイを行うために必要な物質の全てもしくは一部を含むこともできる。

【００７２】

配列番号１～１９７を表５に集約した。配列番号１～１９７のそれぞれにおいて、マーカーは、所定の配列番号に対応する、任意の変異体、対立遺伝子等をコードする遺伝子を表わすｐｓｉｄもしくはアフィメトリクスプロセットＩＤ（Affymetrix Proset ID）によって同定される。またマーカーは、所定のｐｓｉｄに対応したプローブによって認識されるｍＲＮＡをコードする遺伝子として定められている。

【００７３】

以下の実施例は説明のために提供するものであり、主張する発明を制限するものではない。本明細書に言及する全ての文献は、参照することを以って本明細書に組み込まれる。本発明に従って分析された遺伝子は、通常は、タンパク質もしくはペプチドの生産をコードする完全長の核酸配列に関連する。当業者であれば、完全長の配列の同定が、解析の観点から必ずしも必要でないことを理解できよう。すなわち、配列の一部もしくはＥＳＴは、対応する遺伝子の遺伝子発現を評価する目的でプローブをデザインできる、周知の原理にしたがって選択することができる。

【００７４】

〔実施例１〕

腫瘍塊データセットとＬＣＭにより得られた試料データセットとの間の、２１個の継続的に発現しているハウスキーピング遺伝子の発現強度の比較

乳房の上皮細胞におけるエストロゲンによって誘発される機構について知見を得るため

に、本発明者らは、１７のＥＲ＋の腫瘍と１１のＥＲ－の腫瘍とからなる２８の早期の原発性乳房腫瘍のセットにＬＣＭ技術を応用した。次に、Affymetrix Gene Chip Hu133Aを用いてそれらの遺伝子発現プロファイルを解析した。

【００７５】

本研究で用いられた乳房腫瘍は、エラスムス・メディカル・センター（Erasmus Medical Center）（オランダロッテルダム（Rotterdam, Netherlands））の腫瘍バンクから選択された。これらの試料は、ステロイドホルモン受容体の状態の通常の評価のために実験室に提出され、それ以降液体窒素中で保管された。コードを付与された腫瘍組織を使用する本研究は、オランダの医科学協会連合の行動規範（Code of Conduct of the Federation of Medical Scientific Societies in the Netherlands）に準拠して行われた。本研究はエラスムス・メディカル・センター（Erasmus Medical Center）の機関の医療倫理委員会（institutional Medical Ethical Committee）により承認された。患者は、１９８３年から１９９４年までの間にステージＩおよびステージＩＩａと診断され、平均年齢は４９歳（範囲：２９歳～７４歳）であった。これらの乳房腫瘍はほとんどが浸潤性乳管癌（ＩＤＣ）であり、腫瘍の一部では非浸潤性乳管癌（ＤＣＩＳ）も存在していた。表１にこれらの患者の臨床的特徴が明記されている。２５人の患者は乳房温存手術を、３人は乳房切除術を受けた。

【表１】

特徴	患者数（%）
年齢（歳）	
<40	2 (7)
40-44	5 (17)
45-49	8 (27)
>=50	15 (50)
腫瘍径（mm）	
<=20	11 (37)
>20	18 (60)
組織学的悪性度	
II（中）	5 (17)
III（高）	12 (40)
リンパ節転移	
陰性	28 (100)
外科手術	
乳房温存手術	25 (89)
乳房切除術	3 (11)
化学療法	
なし	28 (100)
ホルモン療法	
なし	28 (100)

【００７６】

全ての患者は腋窩リンパ節の切開を受け、示唆された場合には続けて放射線治療を受けた。ネオアジュバント療法を施されたものはいなかった。腫瘍は直径５ｃｍ未満の大きさの原発性の浸潤性乳管癌（ｐＴ１もしくはｐＴ２）と特徴付けられた。手術の時点ではリンパ節転移は見られなかった。ＥＲの状態は、前述のようにリガンド結合アッセイもしくは酵素免疫測定によって決定した（フォーケンス（Foekens）ら、１９８９）。腫瘍をＥＲ＋とＥＲ－に区別するために、細胞質ゾルタンパク質１０ｆｍｏｌ／ｍｇのカットオフ値を用いた。遺伝子発現プロファイルを作成するために、平均１０００個の腫瘍細胞を腫瘍塊の新鮮凍結切片から得た。マイクロアレイ解析のために十分な量のビオチン標識されたａＲＮＡを得るため、T7-based ＲＮＡリニア増幅が行われた（カメ（Kamme）ら、２０

０４）。TargetAmp RNA増幅キット（ウィスコンシン州のエピセンター社（Epicenter, WI））を使用し、２回目の増幅のラウンドビオチン標識のステップをAffymetrix Enzoキット（カリフォルニア州のアフィメトリクス社（Affymetrix, CA））と入れ替えて使用することによって、２回の増幅ラウンドの後、平均サイズ分布がおよそ２０００ヌクレオチド長のａＲＮＡが、平均して６０μｇ産生された。増幅力は初期全ＲＮＡからおよそ10^6倍であった。増幅されたＲＮＡの複製から得られた遺伝子発現データの直線回帰分析は０．９６のR^2値を示した。２ラウンドのT7-based ＲＮＡリニア増幅の良好な忠実度と再現性がいくつかの報告の中で示されており（ルッツィ（Luzzi）ら、２００３；マ（Ma）ら、２００３）、Affymetrix GeneChip（登録商標）では、アレイのプローブのセットが３’末端配列を使用するように設計されているために、転写産物の３’末端側での増幅は全体の転写プロファイルに大きな影響を与えなかった（ルッツィ（Luzzi）ら、２００３）。さらに、増幅方法は、増幅しない方法と比較して、異なって発現している遺伝子を同定する感度を増加させることを示した（ポラセック（Polacek）ら、２００３）。本研究の増幅方法がＬＣＭによって得られたＲＮＡ試料中でｍＲＮＡ存在量を正確に保持していることを確認するために、ＬＣＭによって得られた試料と腫瘍塊の試料との間で、２１の構造的に発現しているハウスキーピング遺伝子の発現レベルを比較した（図１）。これらの２１の遺伝子は、異なった組織のタイプにわたる正常、良性および腫瘍の試料からの遺伝子発現プロファイルの大きなコレクションに基づいて選択された。２ラウンドで増幅されたＬＣＭ試料から得られた２１の遺伝子の発現レベルと、対応する腫瘍塊の試料からのそれとの間には、統計的に有意な差は見られなかった。ゆえに、本発明者らの結果は、２ラウンドのT7-based ＲＮＡ増幅がＲＮＡ試料中でｍＲＮＡの存在量を正確に保持していると公表された研究と合致しており、ＬＣＭとＲＮＡ増幅の組み合わせは遺伝子発現プロファイルに対する信頼に足るアプローチである。

【００７７】

腫瘍塊の遺伝子発現データを生成するために、トリゾール法（Trizol method）（カリフォルニア州のインビトロジェン社（Invitrogen, CA））を使用して全ＲＮＡ試料を抽出した。次に目的物はビオチン標識され、製造会社のマニュアルにしたがってGeneChip Hu133A（カリフォルニア州アフィメトリクス社（Affymetrix, CA））とハイブリダイズされた。ＬＣＭによって得られた試料のデータセットに対しては、ＰＡＬＭ（登録商標）マイクロレーザーシステムとZEISS Axiovert 135（ドイツＰ．Ａ．Ｌ．Ｍ．マイクロレーザーテクノロジーズ社（P.A.L.M. Microlaser Technologies, Germany））、および確立されたプロトコルを使用して腫瘍細胞を得た（カメ（Kamme）ら、２００４）。要するに、埋め込まれた凍結腫瘍標本をCryocut 1800 Reichert-Jung cryotome（ドイツのケンブリッジ・インストルメンツ社（Cambridge Instruments, Germany））を用いて、－１７℃～－２５℃の温度で、１０μｍの厚さの連続切片に切り、ＰＥＮ（ポリエチレンナフタレート）膜スライド（ドイツＰ．Ａ．Ｌ．Ｍ．マイクロレーザーテクノロジーズ社（P.A.L.M. Microlaser Technologies, Germany））に載せた。

【００７８】

Ｈ＆Ｅ染色のために、スライドを徐々に濃度の低くなる一連のエタノール溶液に連続的に５回浸し、ハリス－ヘマトキシリン溶液（ミズーリ州セントルイスのシグマ社（Sigma, St.Louis, MO））に３０秒間浸し、脱イオン化水で軽く洗い、エオシンＹ（Eosin Y）（ミズーリ州セントルイスのシグマ社（Sigma, St.Louis, MO））に５回浸し、９５％エタノールと１００％エタノールで洗浄した。１０分間空気乾燥した後、スライドはＬＣＭ処置に使えるようになる。それぞれの腫瘍試料について、最初と最後の組織切片はガラススライドに載せ、Ｈ＆Ｅ染色の後にキシレンに埋め込まれ、これは診断の際の基準および確認として役に立つ。次に腫瘍細胞を含んでいる部位は、独立してスライドから単離され、１００％エタノール中で保管される。レーザーで採取した細胞の全ＲＮＡは、RNeasy緩衝液（ドイツ、キアゲン社（Qiagen, Germany））で抽出され、Zymo spin-column(カリフォルニア州、ザイモ・リサーチ社（Zymo Research, CA））を使用して回収された。次に、ＲＮＡ試料は本文で述べているような変更を加えたTargetAmp（商標）キットで増幅され

た。最終のビオチン標識されたａＲＮＡ産物は、GeneChip Hu133Aとハイブリダイズされた。データ解析のために、スキャンされたチップの画像はMicroarray Analysis suite5.0（カリフォルニア州アフィメトリクス・インコーポレイティッド（Affymetrix Inc., CA））を使用して処理された。個々のマイクロアレイの画像データは、平均強度が６００になるように個別に増減された。品質管理基準は以下のとおりである:ＲａｗＱは４未満、バックグラウンドは１００未満、スケーリングファクターは４未満、「存在（Present）」の判定が３５％より大きい、であった。青と黄色のバーはそれぞれ腫瘍塊とＬＣＭ試料の発現レベルを表わしている。エラーバーはそれぞれのデータセットの２８の実験の標準偏差を表わしている。ｔ－検定を用いてｐ値を得た。０．０１未満のｐ値は、２つのデータセットの間で有意差があると考えられた。結果は図１に図示した。
)

【００７９】

〔実施例２〕

ジーン・スプリング・ソフトウェア（Gene Spring software）を使用した、包括的遺伝子発現データの教師なし２次元階層的クラスタリング分析

Affymetrix U133Aチップの約２３０００のプローブセットの遺伝子発現強度を、まず分位点正規化法（quantile normalization method）によって正規化し、次にAffymetrix MAS 5.0ソフトウェアによって決定された「存在（Present）」判定を用いてフィルターした。発現パターンの類似性に基づいて遺伝子をグループ化するため、および包括的遺伝子発現プロファイルの類似性に基づいて試料をクラスター化するために、教師なし二次元階層的クラスタリングアルゴリズムがマイクロアレイデータに適用された。図２に示したように、５６の試料（２８のＬＣＭ、および２８の組織塊）はＲＮＡ抽出のソース（ＬＣＭによって得られた腫瘍細胞と、腫瘍塊から得られた、混合された細胞集団）に応じて大きな２つのグループにクラスター化された。それぞれのグループ内で、試料はさらに２つのサブグループ（ＬＣＭ試料内のグループＡとＢ、組織塊試料のグループＣとＤ）にクラスター化された。これらのサブグループが臨床的なパラメータと関連がある可能性を調べたところ、ＥＲの状態がこの分類と最も大きな相関を持っていた。ＬＣＭデータセットでは、ＥＲ＋と診断された１７の腫瘍のうち、１５個が同じサブグループ（サブグループＡ）に分類され、１つはそれ自身でサブグループを形成し、１つはＥＲ－のグループに分類された。１１のＥＲ－の腫瘍のうち１０個はサブグループＢに分類され、カイ二乗検定の推定Ｐ値は０．０００６であった。１つのＥＲ－の腫瘍はＥＲ＋の腫瘍にクラスター化された。腫瘍塊のデータセットに関しては、同じ１５のＥＲ＋の試料が正しいカテゴリ（サブグループＣ）に分類され、同じ１つのＥＲ－の試料がＥＲ＋のグループにクラスター化された。ＥＲ－のサブグループに分類された２つのＥＲ＋の腫瘍は、チップのデータ上でエストロゲン受容体の発現が非常に低かった一方で、ＥＲ＋のサブグループに分類された１つのＥＲ－の腫瘍は、チップ上で高い発現を示していた。通常の評価によるＥＲの状態と遺伝子発現データとの間の不一致は、おそらく腫瘍の不均一性もしくはこれらの腫瘍でのＥＲ発現の転写後制御によるものであろう。

【００８０】

〔実施例３〕

ＥＲ＋のサブグループとＥＲ－のサブグループの間の、異なって発現している遺伝子の経路分析

ＥＲの状態に関連する遺伝子およびその関連する経路を同定するために、ＥＲ＋のサブグループとＥＲ－のサブグループとの間のｔ－検定を、２つのデータセットのそれぞれにおいて行った。ボンフェローニ補正されたＰ値＜０．０５をカットオフに用いて、ＬＣＭによって得られた試料のデータセットで１４６の特有の遺伝子を表す１７５のプローブセットが見出され、腫瘍塊データセットで１１２の特有の遺伝子を表す１３０のプローブセットが同定された。これら２つの遺伝子リストを比較することによって、６１の遺伝子が共通であることが見出され、８５の遺伝子がＬＣＭによって得られた試料に特有であり、５１の遺伝子が腫瘍塊の試料の中にのみ存在した（図３Ａ；表２、表３、表４）。６１の

共通な遺伝子のうち、ＥＲ＋のサブグループの中で３６個は比較的過剰に発現しており、２５はダウンレギュレートされていた（表２）。エストロゲン受容体は、トレフォイル因子１と３、ＧＡＴＡ３、Ｘ－ボックス結合タンパク質１（ＸＢＰ１）、およびケラチン１８のようなＥＲの活性化に関連していることが知られている他の遺伝子と供に、アップレギュレートされている遺伝子に含まれる（ソティリオ（Sotiriou）ら、２００３；グラブバーガー（Gruvberger）ら、２００１；ソン（Sun）ら、２００５）。一方で、Ｐ－カドヘリン（ＣＤＨ３）、ＧＡＢＲＰ、およびＦｒｉｚｚｌｅｄ関連分泌タンパク質１（secreted frizzled-related protein 1）（ＳＦＲＰ１）はダウンレギュレートされた遺伝子のリストに現れている。

【表２－１】

表２

ＥＲ＋の腫瘍とＥＲ－の腫瘍との間で発現の異なる、ＬＣＭ試料データセットおよび腫瘍塊データセットに共通な遺伝子

配列番号	アフィメトリクス プロセットＩＤ	ｐ値	相対発現*
23	200670_at	1.03E-07	+
33	200747_s_at	3.24E-07	+
5	200811_at	7.35E-10	+
40	201030_x_at	5.11E-07	-
29	201596_x_at	1.92E-07	+
24	201795_at	1.12E-07	-
61	202035_s_at	3.13E-06	-
48	202342_s_at	1.14E-06	-
58	202345_s_at	2.83E-06	-
53	202554_s_at	1.67E-06	+
46	202908_at	9.59E-07	+
60	203256_at	3.03E-06	-
34	203263_s_at	3.49E-07	-
49	203453_at	1.17E-06	+
13	203712_at	3.09E-08	-
35	203909_at	3.51E-07	-
3	203928_x_at	2.45E-10	+
11	204304_s_at	9.30E-09	-
8	204508_s_at	4.40E-09	+
6	204623_at	1.11E-09	+
43	204872_at	7.34E-07	-
54	204915_s_at	2.58E-06	-
14	205009_at	4.34E-08	+
19	205044_at	7.53E-08	-
7	205225_at	1.99E-09	+
59	205376_at	3.00E-06	+
27	205548_s_at	1.85E-07	+
51	205862_at	1.24E-06	+
30	206392_s_at	2.02E-07	-
15	206755_at	4.71E-08	+
57	206838_at	2.79E-06	-
32	207828_s_at	3.22E-07	-
2	208682_s_at	5.33E-11	+
39	209191_at	4.94E-07	-
12	209460_at	9.44E-09	+
22	209602_s_at	9.40E-08	+
17	209696_at	5.00E-08	+
26	209791_at	1.51E-07	-
9	210347_s_at	4.60E-09	-
41	211712_s_at	5.15E-07	+
37	212441_at	4.65E-07	+
1	212494_at	4.31E-11	+
55	212496_s_at	2.66E-06	+
21	212638_s_at	8.19E-08	+
18	212692_s_at	6.49E-08	+
38	212744_at	4.72E-07	+
25	212956_at	1.46E-07	+

【表２－２】

47	212985_at	1.12E-06	+
42	213923_at	5.43E-07	-
10	214053_at	7.33E-09	+
16	214440_at	4.94E-08	+
20	214745_at	8.03E-08	-
4	216092_s_at	2.94E-10	+
52	218211_s_at	1.30E-06	+
45	219197_s_at	7.64E-07	+
56	220016_at	2.76E-06	+
31	220230_s_at	2.98E-07	-
28	220540_at	1.85E-07	-
50	221203_s_at	1.20E-06	-
36	221920_s_at	3.63E-07	-
44	222125_s_at	7.43E-07	+

【表３－１】

表３

ＥＲ＋の腫瘍とＥＲ－の腫瘍との間で発現の異なる、腫瘍塊データセットに特有の遺伝子

配列番号	アフィメトリクス プロセットＩＤ	ｐ値	相対発現*
92	200719_at	7.48E-07	+
66	200804_at	2.13E-08	+
65	201037_at	1.46E-08	-
93	201754_at	8.40E-07	+
100	202089_s_at	1.32E-06	+
67	202897_at	2.52E-08	-
62	202982_s_at	2.58E-09	+
111	203287_at	2.95E-06	-
110	203773_x_at	2.83E-06	+
83	204284_at	4.04E-07	+
73	204540_at	1.60E-07	+
97	204567_s_at	1.01E-06	+
90	204667_at	6.42E-07	+
64	204822_at	1.03E-08	-
105	205081_at	1.95E-06	+
63	205186_at	6.07E-09	+
112	206249_at	2.99E-06	-
88	207571_x_at	6.14E-07	-
80	208788_at	3.37E-07	+
77	208873_s_at	2.82E-07	+
72	209114_at	1.54E-07	+
69	209122_at	2.87E-08	-
103	209324_s_at	1.88E-06	-
96	209870_s_at	9.47E-07	-
98	210397_at	1.23E-06	-
75	210845_s_at	2.22E-07	-
85	211063_s_at	5.32E-07	-
74	211967_at	2.12E-07	-
70	212276_at	4.99E-08	-
81	212501_at	3.47E-07	-
76	213634_s_at	2.33E-07	+
94	213651_at	8.46E-07	+
101	214431_at	1.37E-06	-
71	215304_at	8.52E-08	+
107	215329_s_at	2.27E-06	+
89	216988_s_at	6.25E-07	+
108	217979_at	2.28E-06	+
95	218104_at	8.55E-07	-
87	218195_at	5.72E-07	+
106	218239_s_at	2.22E-06	-
104	218532_s_at	1.92E-06	+
78	218534_s_at	3.10E-07	+
91	218854_at	6.51E-07	-
109	218966_at	2.40E-06	+

【表３－２】

99	219615_s_at	1.25E-06	-
84	219918_s_at	4.21E-07	-
79	220425_x_at	3.22E-07	-
86	221834_at	5.37E-07	+
68	221934_s_at	2.72E-08	+
82	51158_at	3.56E-07	+
102	60471_at	1.46E-06	-

【表４－１】

表４

ＥＲ＋の腫瘍とＥＲ－の腫瘍との間で発現の異なる、ＬＣＭ試料データセットに特有の遺伝子

配列番号	アフィメトリクス プロセットＩＤ	ｐ値	相対発現*
193	200790_at	2.38E-06	-
113	200824_at	1.08E-09	-
182	201012_at	2.06E-06	-
176	201215_at	1.92E-06	+
133	201300_s_at	2.77E-07	-
164	201407_s_at	1.39E-06	-
137	201564_s_at	3.84E-07	-
150	201636_at	9.98E-07	-
128	201833_at	2.36E-07	-
152	201915_at	1.02E-06	-
120	201980_s_at	1.29E-07	-
158	202121_s_at	1.22E-06	+
192	202146_at	2.36E-06	-
142	202207_at	6.93E-07	-
140	202320_at	5.21E-07	+
189	202772_at	2.26E-06	+
117	203384_s_at	3.26E-08	+
121	203682_s_at	1.30E-07	+
115	203702_s_at	2.17E-08	-
149	204688_at	9.46E-07	-
125	204751_x_at	1.97E-07	-
183	204785_x_at	2.12E-06	-
126	204881_s_at	2.07E-07	+
159	205109_s_at	1.27E-06	-
127	205300_s_at	2.16E-07	+
122	205363_at	1.31E-07	-
186	205429_s_at	2.21E-06	-
123	205471_s_at	1.65E-07	+
195	205996_s_at	2.53E-06	-
167	206364_at	1.53E-06	-
170	206565_x_at	1.61E-06	+
155	208103_s_at	1.15E-06	-
114	208358_s_at	1.05E-08	-
151	209025_s_at	1.01E-06	-
178	209170_s_at	1.97E-06	-
175	209173_at	1.90E-06	+
143	209396_s_at	6.97E-07	-
147	209494_s_at	8.55E-07	+
130	209531_at	2.54E-07	+
160	209631_s_at	1.30E-06	-
179	209745_at	2.00E-06	+
169	210319_x_at	1.59E-06	+
163	210466_s_at	1.38E-06	-

【表４－２】

194	210648_x_at	2.43E-06	－
188	210687_at	2.23E-06	＋
168	210886_x_at	1.54E-06	＋
154	210942_s_at	1.07E-06	－
180	211110_s_at	2.03E-06	＋
146	212314_at	8.36E-07	－
190	212442_s_at	2.28E-06	＋
196	212462_at	2.65E-06	＋
181	212508_at	2.06E-06	＋
174	212759_s_at	1.88E-06	－
156	212780_at	1.17E-06	－
161	212846_at	1.35E-06	－
136	213260_at	3.42E-07	－
162	213419_at	1.37E-06	＋
197	214806_at	2.87E-06	－
173	215723_s_at	1.85E-06	－
187	217028_at	2.22E-06	－
138	217823_s_at	4.37E-07	－
132	217838_s_at	2.60E-07	＋
131	217929_s_at	2.55E-07	＋
118	218236_s_at	5.30E-08	－
184	218440_at	2.13E-06	－
119	218483_s_at	1.17E-07	＋
172	218489_s_at	1.83E-06	＋
165	218618_s_at	1.44E-06	－
124	218931_at	1.83E-07	＋
157	219010_at	1.20E-06	－
129	219100_at	2.40E-07	＋
134	219212_at	2.87E-07	－
177	219562_at	1.92E-06	－
145	219686_at	8.16E-07	＋
148	219806_s_at	9.21E-07	－
185	219861_at	2.19E-06	＋
153	219889_at	1.06E-06	＋
139	220173_at	4.62E-07	＋
191	220432_s_at	2.34E-06	－
166	220533_at	1.51E-06	－
141	220658_s_at	5.50E-07	－
171	221562_s_at	1.67E-06	＋
135	221641_s_at	3.40E-07	－
144	222011_s_at	7.79E-07	－
116	52940_at	2.90E-08	＋

【００８１】

遺伝子オントロジーの注釈を使用して、３つの遺伝子リスト（図３Ｂ、図３Ｃ、および図３Ｄ）について特徴ある経路がＰ値＜０．０５で同定された。６１の遺伝子について、最も重要な経路は、微小管細胞骨格構成経路（microtubule cytoskeleton organization

pathway）であることが判明した。この経路には防御応答、細胞増殖の負の調節、解糖、消化、視覚、ナトリウムイオン輸送、イオン輸送、および形態形成経路が続く。細胞増殖の負の調節経路には、その中でＥＲ＋腫瘍でレチノイン酸受容体応答細胞（retinoic acid receptor responder）（タザロテンにより誘導）１、およびＢＴＧファミリーのメンバー３遺伝子がダウンレギュレートされていることが見出されたが、共通の遺伝子リストの関連するほとんどの遺伝子を有する。興味深い発見としては、微小管細胞骨格の構成と生物発生（biogenesis）の経路の微小管関連タンパク質タウ（ＭＡＰＴ）の、ＥＲ＋乳房腫瘍内でのアップレギュレーションである。この遺伝子は神経系で異なって発現しており（バインダー（Binder）ら、１９８５）、その変異はいくつかの神経変性疾患を引き起こす（スピランティーニ（Spillantini）ら、１９９８）。この遺伝子が植物性エストロゲンイソフラボンの経口摂取と相互に関連して、霊長類の脳内で抑制されることは報告されていたが（キム（Kim）ら、２００１）、乳房腫瘍細胞中のＥＲの状態と関連したアップレギュレーションはこれまで示されたことがない。

【００８２】

ＬＣＭ試料に特有な遺伝子リストの中で同定された重要な経路は、以下の、スフィンゴ糖脂質生合成、エンドサイトーシス、ＲＡＳ蛋白質シグナル伝達、中枢神経系発達、代謝、および同種親和性細胞接着（homophilic cell adhesion）である。ＵＤＰ－グルコースセラミドグルコシルトランスフェラーゼ、およびＵＤＰグリコシルトランスフェラーゼ８は、セラミド（分化、老化、増殖、およびアポトーシスを促進するシグナル伝達カスケードへの二次メッセンジャーとして機能する）などのスフィンゴ糖脂質生合成に関係する（シメステイン（Simstein）ら、２００３）。ＥＲ経路内部での相互作用の基礎となる機構は未知であるにもかかわらず、セラミド生成はタモキシフェン誘発アポトーシスに付随し（マンドレカー（Mandlekar）ら、２００１）、おそらくは細胞外シグナル制御キナーゼ（ＥＲＫ）を通してエストロゲンの反アポトーシスシグナル伝達経路を阻害する（チェン（Chen）ら、２００５）とされた。さらに、別の同定された経路であるエンドサイトーシスは、乳癌内で、Ｅｐｈ／エフリンシグナル伝達経路（ＪＡＴ－ＳＴＡＴ経路を交差活性化する）を通して細胞の接着と遊走に関連していた（フォックス（Fox）ら、２００４；ポリアコフ（Poliakov）ら、２００４）。ＲＡＳ癌遺伝子ファミリーのメンバー（ＲＡＢ１７およびＲＡＢ２６）は、ＲＡＳタンパク質シグナル伝達に関わる遺伝子（ＳＯＳＩおよびＰＬＤ１）とともに同定された。活動亢進したＲａｓは、乳癌の成長および発症を促進する可能性があり、ＥＲＫ／ＡＫＴシグナル伝達経路の上流に影響を与える（エッカート（Eckert）ら、２００４）。ＭＣＦ７細胞中で、Ｒａｓの活動は、エストラジオールに反応したｐ２７の核外輸送と分解に必要であり、培地内での乳癌細胞の生存を促進する際の新たな非遺伝子的な経路を仲介したということが示されている（フェルナンド（Fernando）ら、２００４）。

【００８３】

形質転換成長因子β（ＴＧＦ－β）は腫瘍形成の初期と終期の段階で腫瘍抑制効果と促進効果の両方を持つことが示されている（アクハースト（Akhurst）ら、２００１）。ＤＮＡ依存性もしくは非依存性の様式で、ＴＧＦ－βシグナル伝達とエストロゲンシグナル伝達との間のクロストークが示されている（マツダ（Matsuda）ら、２００１；ウー（Wu）ら、２００３；アマナマンシ（Ammanamanchi）ら、２００４）。ＴＧＦ－βシグナル伝達に影響すると示唆されていたいくつかの遺伝子が、共通の遺伝子リストとＬＣＭに特有の遺伝子リストで同定された。ＷＷドメイン含有蛋白質１（ＷＷＰ１）は、上皮で発現するＥ３ユビキチンリガーゼであるが、ＴＧＦ－βＩ型受容体のユビキチン化を誘導しＴＧＦ－βＩ型受容体を劣化させることを通して、ＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害することが見出された（マルベルト‐コーラス（Malbert-Colas）ら、２００３；コムロ（Komuro）ら、２００４）。ソティリオ（Sotiriou）ら（２００３）も、彼らのＥＲの状態に関連する遺伝子のリストの中にこの遺伝子を見出しているが、そのＥＲ経路との相互作用については依然として未知である。ＤＡＣＨ１は、乳癌細胞株においてＳｍａｄ４への結合を通してＴＧＦ－βが誘発するアポトーシスを阻害することが示されており、このＳｍａｄ４

は、ＥＲ－αのＡＦ１ドメインとの相互作用によるＥＲ－αの転写抑制補体である（ウー（Wu）ら、２００３）。ＦＯＸＣ１は、ＤＡＣＨ１のレギュレーターであるが（タミミ（Tamimi）ら、２００４）、これもＬＣＭ試料に特有な遺伝子のリストに存在していた。ＷＷＰ１およびＤＡＣＨ１のアップレギュレーションは、ＴＧＦ－βシグナル伝達がＥＲ＋の腫瘍内で抑制されていることを示唆した。さらにＬＣＭに特有な遺伝子のリストには、ＤＮＡ依存性転写制御、細胞表面受容体とリンクしたシグナル伝達、細胞の接着／運動性、代謝酵素、およびアポトーシスなどの、ＥＲ経路に関連する機能に関与する遺伝子がある。それらの中で、いくつかの遺伝子はＥＲと相互作用することが知られており、それは例えばＨＤＡＣ２、ＡＮＸＡ１、およびＣＣＮＢ１である。これらの遺伝子の潜在的な役割と、それらのＥＲとの関係をさらに詳しく調べることは、これらの経路間の相互関係およびエストロゲンシグナル伝達についての知見を提供するだろう。

【００８４】

一方で、腫瘍塊の試料に特有な遺伝子については、走化性と抗菌体液性応答に関連する経路が上位に挙げられた。システインリッチ蛋白質１（ＣＲＩＰ１）は、ヒトの末梢血単核細胞中で産生されており、宿主防衛に関連している（クー（Khoo）ら、１９９７）。ラジニン１（ＬＡＤ１）は、基底膜蛋白質であり、おそらく上皮層と下層の間葉との結合の安定化に寄与している（マリンコヴィッチ（Marinkovich）ら、１９９６）。

【００８５】

上述の発明は、理解し易いように例示および例を用いて、詳細に説明してきたが、この説明および例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきではない。

【００８６】

表５　配列同定

配列番号	psid	名称	寄託番号	説明
1	212494_at	TENC1	AB028998	テンシン様 C1 ドメイン含有ホスファターゼ
2	208682_s_at	MAGED2	AF126181	黒色腫抗原、ファミリーD、2
3	203928_x_at	MAPT	AI870749	微小管関連蛋白質タウ
4	216092_s_at	SLC7A8	AL365347	溶質キャリアファミリー7（陽イオンアミノ酸トランスポーター、y+システム）メンバー8
5	200811_at	CIRBP	NM_001280	低温誘導性 RNA 結合蛋白質
6	204623_at	TFF3	NM_003226	トレフォイル因子 3（腸）
7	205225_at	ESR1	NM_000125	エストロゲン受容体 1
8	204508_s_at	CA12	BC001012	炭酸脱水酸素 XII
9	210347_s_at	BCL11A	AF080216	B 細胞 CLL/リンパ腫 11A（ジンクフィンガー蛋白質）
10	214053_at	ERBB4	AW772192	V-erb-a 赤芽球白血病ウイルス癌遺伝子同族体 4（鳥類）
11	204304_s_at	PROM1	NM_006017	プロミニン 1
12	209460_at	ABAT	AF237813	4-アミノ酪酸アミノ基転移酵素
13	203712_at	KIAA0020	NM_014878	KIAA0020
14	205009_at	TFF1	NM_003225	トレフォイル因子 1（乳癌において発現するエストロゲン誘発性配列）
15	206755_at	CYP2B6	NM_000767	シトクロム P450、ファミリー2、サブファミリーB、ポリペプチド 6
16	214440_at	NAT1	NM_000662	N-アセチルトランスフェラーゼ 1（アリールアミン N-アセチルトランスフェラーゼ）
17	209696_at	FBP1	D26054	フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ 1
18	212692_s_at	LRBA	W60686	LPS 感受性小胞輸送、ビーチおよびアンカーを含む
19	205044_at	GABRP	NM_014211	ガンマ-アミノ酪酸（GABA）A 受容体、π
20	214745_at	PLCL3	AW665865	ホスホリパーゼ C 類似 3
21	212638_s_at	WWP1	BF131791	WW ドメイン含有 E3 ユビキチンタンパクリガーゼ 1
22	209602_s_at	GATA3	AI796169	GATA 結合蛋白質 3
23	200670_at	XBP1	NM_005080	X-box 結合蛋白質 1
24	201795_at	LBR	NM_002296	ラミン B 受容体
25	212956_at	KIAA0882	AI348094	KIAA0882 蛋白質
26	209791_at	PADI2	AL049569	ペプチジルアルギニンデルミナーゼ、II 型
27	205548_s_at	KCNK15	NM_022358	カリウムチャネル、サブファミリーK、メンバー15
28	220540_at	BTG3	NM_006806	BTG ファミリー、メンバー3
29	201596_x_at	KRT18	NM_000224	ケラチン 18
30	206392_s_at	RARRES1	NM_002888	レチノイン酸受容体応答細胞（タザロテンによる誘導）1

【表５－２】

31	220230_s_at	CYB5R2	NM_016229	シトクロム b5 リダクターゼ b5R.2
32	207828_s_at	CENPF	NM_005196	セントロメア蛋白質 F、350/400ka（マイトシン）
33	200747_s_at	NUMA1	NM_006185	核有糸分裂装置蛋白質 1
34	203263_s_at	ARHGEF9	AI625739	Cdc42 グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）9
35	203909_at	SLC9A6	NM_006359	溶質キャリアファミリー9（ナトリウム/水素交換体）イソ型 6
36	221920_s_at	MSCP	BE677761	ミトコンドリア溶質キャリア蛋白質
37	212441_at	KIAA0232	D86985	KIAA0232 遺伝子産物
38	212744_at	BBS4	AI813772	バルデ－ビードル症候群 4
39	209191_at	MGC4083	BC002654	チューブリン β MGC4083
40	201030_x_at	LDHB	NM_002300	乳酸脱水素酵素 B
41	211712_s_at	ANXA9	BC005830	アネキシン A9
42	213923_at	RAP2B	AW005535	RAS 癌遺伝子ファミリーのメンバー
43	204872_at	TLE4	NM_007005	split4 のトランスデューシン様エンハンサー（E(sp1)同族体、ショウジョウバエ）
44	222125_s_at	PH-4	BC000580	低酸素症誘導因子プロリル 4-ヒドロキシラーゼ
45	219197_s_at	SCUBE2	NM_020974	シグナルペプチド、CUB ドメイン、EGF 様-2
46	202908_at	WFS1	NM_006005	ウルフラム症候群 1（ウルフラミン）
47	212985_at	CCNB1	BF115739	サイクリン B1
48	202342_s_at	TRIM2	NM_015271	3 要素モチーフ含有 2
49	203453_at	SCNN1A	NM_001038	ナトリウムチャネル、電位非依存性 1_
50	221203_s_at	YEATS2	NM_018023	YEATS ドメイン含有 2
51	205862_at	GREB1	NM_014668	GREB1 蛋白質
52	218211_s_at	MLPH	NM_024101	メラノフィリン
53	202554_s_at	GSTM3	AL527430	グルタチオン S-トランスフェラーゼ M3（脳）
54	204915_s_at	SOX11	AB028641	SRY（性決定領域 Y）-ボックス 11
55	212496_s_at	JMJD2B	AW237172	Jumonji ドメイン含有 2B
56	220016_at	MGC5395	NM_024060	仮想蛋白質 MGC5395
57	206838_at	TBX19	NM_005149	T-ボックス 19
58	202345_s_at	FABP5	NM_001444	脂肪酸結合蛋白質 5（乾癬関連）
59	205376_at	INPP4B	NM_003866	イノシトールポリリン酸塩-4-ホスファターゼ、II 型、105kDa
60	203256_at	CDH3	NM_001793	カドヘリン 3、1 型、P-カドヘリン（胎盤）
61	202035_s_at	SFRP1	AF017987	Frizzled 関連分泌蛋白質 1
62	202982_s_at	ZAP128	NM_006821	ペルオキシソーム長鎖アシル-CoA チオエステラーゼ
63	205186_at	DNALI1	NM_003462	ダイニン、軸糸、軽中間体ポリペプチド 1
64	204822_at	TTK	NM_003318	TTK プロテインキナーゼ

【表５－３】

65	201037_at	PFKP	NM_002627	ホスホフルクトキナーゼ、血小板
66	200804_at	TEGT	NM_003217	精巣で増強される遺伝子の転写産物（BAXインヒビター1）
67	202897_at	PTPNS1	AB023430	プロテインチロシンホスファターゼ、非受容体型基質1
68	221934_s_at	FLJ10496	BF941492	仮想蛋白質 FLJ10496
69	209122_at	ADFP	BC005127	脂肪分化関連蛋白質
70	212276_at	LPIN1	D80010	リピン-1
71	215304_at	NA	U79293	クローン23948　mRNA配列
72	209114_at	TSPAN-1	AF133425	テトラスパン1
73	204540_at	EEF1A2	NM_001958	真核生物翻訳延長因子1_2
74	211967_at	PORIMIN	BG538627	腫瘍症促進受容体誘導性膜損傷遺伝子
75	210845_s_at	PLAUR	U08839	プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ受容体
76	213634_s_at	CELSR1	AL031588	カドヘリン、EGF LAG 7パス G 型受容体1（フラミンゴ同族体、ショウジョウバエ）
77	208873_s_at	C5orf18	BC000232	第5染色体読み取り枠18
78	218534_s_at	VG5Q	NM_018046	血管新生因子 VG5Q
79	220425_x_at	ROPN1	NM_017578	ロッポリン、ロフィリン関連蛋白質1
80	208788_at	ELOVL5	AL136939	ELOVL ファミリーメンバー5、長鎖脂肪酸伸長（FEN1/Elo2, SUR4/Elo3）
81	212501_at	CEBPB	AL564683	CCAAT/エンハンサー結合蛋白質（C/EBP）、_
82	51158_at	LOC400451	AI801973	AK075564、BC060873 に支持される仮想遺伝子
83	204284_at	PPP1R3C	N26005	プロテインホスファターゼ1、調節（阻害）サブユニット3C
84	219918_s_at	ASPM	NM_018123	asp（異常紡錘体）様、小頭症関連（ショウジョウバエ）
85	211063_s_at	NCK1	BC006403	NCK アダプター蛋白質1
86	221834_at	LONP	AV700132	ペルオキシソームイオンプロテアーゼ
87	218195_at	C6orf211	NM_024573	第6染色体読み取り枠211
88	207571_x_at	C1orf38	NM_004848	第1染色体読み取り枠38
89	216988_s_at	PTP4A2	L48722	プロテインチロシンホスファターゼIVA型メンバー2
90	204667_at	FOXA1	NM_004496	フォークヘッド-ボックス A1
91	218854_at	SART2	NM_013352	T細胞2に認識される扁平上皮癌抗原
92	200719_at	SKP1A	BE964043	S期キナーゼ結合蛋白質1A（p19A）
93	201754_at	COX6C	NM_004374	シトクロムc酸化酵素サブユニット Vlc
94	213651_at	PIB5PA	AI935720	ホスファチジルイノシトール（4,5）ビスリン酸　5-ホスファターゼ、A
95	218104_at	TEX10	NM_017746	精巣で発現する配列10
96	209870_s_at	APBA2	AB014719	アミロイドβ（A4）前駆体蛋白質結合、ファミリーA、メンバー2（X11様）
97	204567_s_at	ABCG1	NM_004915	ATP結合カセット、サブファミリーG（WHITE）、メンバー1
98	210397_at	DEFB1	U73945	ディフェンシン、β1

【表５－４】

99	219615_s_at	KCNK5	NM_003740	カリウムチャネル、サブファミリーK、メンバー5
100	202089_s_at	SLC39A6	NM_012319	溶質キャリアファミリー39（亜鉛輸送体）、メンバー6
101	214431_at	GMPS	NM_003875	グアニン１リン酸シンセターゼ
102	60471_at	RIN3	AA625133	Ras-Rab 相互作用 3
103	209324_s_at	RGS16	BF304996	G 蛋白質シグナル伝達調節因子 16
104	218532_s_at	FLJ20152	NM_019000	仮想蛋白質 FLJ20152
105	205081_at	CRIP1	NM_001311	システインリッチ蛋白質１（腸性）
106	218239_s_at	GTPBP4	NM_012341	GTP 結合蛋白質 4
107	215329_s_at	SLC35E2	AL031282	溶質キャリアファミリー35、メンバーE2
108	217979_at	TM4SF13	NM_014399	膜貫通型４スーパーファミリーメンバー13
109	218966_at	MYO5C	NM_018728	ミオシン VC
110	203773_x_at	BLVRA	NM_000712	ビリベルジン還元酵素 A
111	203287_at	LAD1	NM_005558	ラジニン１
112	206249_at	MAP3K13	NM_004721	マイトジェン活性化蛋白質キナーゼキナーゼキナーゼ 13
113	200824_at	GSTP1	NM_000852	グルタチオン S-トランスフェラーゼπ
114	208358_s_at	UGT8	NM_003360	UDP グリコシルトランスフェラーゼ８（UDP-ガラクトースセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ）
115	203702_s_at	TTLL4	AL043927	チューブリンチロシンリガーゼ様ファミリー、メンバー4
116	52940_at	SIGIRR	AA085764	シグナル Ig IL-1R 関連分子
117	203384_s_at	GOLGA1	NM_002077	ゴルジ自己抗原、ゴルジンサブファミリーa、1
118	218236_s_at	PRKD3	NM_005813	蛋白質キナーゼ D3
119	218483_s_at	FLJ21827	NM_020153	仮想蛋白質 FLJ21827
120	201980_s_at	RSU1	NM_012425	Ras 抑制蛋白質 1
121	203682_s_at	IVD	NM_002225	イソヴァレリルコエンザイム A 脱水素酵素
122	205363_at	BBOX1	NM_003986	ブチロベタイン（γ）2-オキソグルタル酸ジオキシゲナーゼ（ブチロベタイン）
123	205471_s_at	DACH1	NM_004392	ダックスフント同族体１（ショウジョウバエ）
124	218931_at	RAB17	NM_022449	RAB17、RAS 癌遺伝子ファミリーのメンバー
125	204751_x_at	DSC2	NM_004949	デスモコリン 2
126	204881_s_at	UGCG	NM_003358	UDP-グルコースセラミドグルコシルトランスフェラーゼ
127	205300_s_at	U1SNRNPBP	NM_022717	U11/U12 snRNP 35k
128	201833_at	HDAC2	NM_001527	ヒストンデアセチラーゼ 2
129	219100_at	OBFC1	NM_024928	オリゴヌクレオチド/オリゴサッカライド結合折れ畳み含有 1
130	209531_at	GSTZ1	BC001453	グルタチオントランスフェラーゼゼータ１（マレイルアセト酢酸イソメラーゼ）
131	217929_s_at	PKD1-like	NM_024874	多発性嚢胞腎１様

【表５－５】

132	217838_s_at	EVL	NM_016337	Enah/Vasp 様
133	201300_s_at	PRNP	NM_000311	プリオン蛋白質（p27-30）
134	219212_at	HSPA14	NM_016299	熱ショック 70kDa 蛋白質 14
135	221641_s_at	ACATE2	AF241787	おそらくマウスアシル-CoA チオエステラーゼ 2 のオルソログ、ミトコンドリア内
136	213260_at	FOXC1	AU145890	フォークヘッドボックス C1
137	201564_s_at	FSCN1	NM_003088	ファシン同族体 1、アクチン-束化蛋白質（ムラサキウニ）
138	217823_s_at	UBE2J1	AF151039	ユビキチン接合酵素 E2、J1（UBC6 同族体、酵母）
139	220173_at	C14orf45	NM_025057	第 14 染色体読み取り枠 45
140	202320_at	GTF3C1	NM_001520	一般転写因子 IIIC、ポリペプチド 1、_ 220kDa
141	220658_s_at	ARNTL2	NM_020183	アリール炭化水素受容体核輸送体様 2
142	202207_at	ARL7	BG435404	ADP-リボシル化因子様 7
143	209396_s_at	CHI3L1	M80927	キチナーゼ 3 様 1（軟骨糖蛋白質-39）
144	222011_s_at	TCP1	BF224073	t-複合体 1
145	219686_at	STK32B	NM_018401	セリン/スレオニンキナーゼ 32B
146	212314_at	KIAA0746	AB018289	KIAA0746 蛋白質
147	209494_s_at	ZNF278	AI807017	ジンクフィンガー蛋白質 278
148	219806_s_at	FN5	NM_020179	FN5 蛋白質
149	204688_at	SGCE	NM_003919	サルコグリカン、イプシロン
150	201636_at	NA	BG025078	ヒト cDNA クローン IMAGE:4364070
151	209025_s_at	SYNCRIP	AF037448	シナプトタグミン結合、細胞質 RNA 結合蛋白質
152	201915_at	SEC63	NM_007214	SEC63 様（出芽酵母）
153	219889_at	FRAT1	NM_005479	進行性 T 細胞リンパ腫で頻繁に再構成される
154	210942_s_at	SIAT10	AB022918	シアリルトランスフェラーゼ 10（α-2,3-シアリルトランスフェラーゼ VI）
155	208103_s_at	ANP32E	NM_030920	酸性（ロイシンリッチな）核リン蛋白質 32 ファミリー、メンバーE
156	212780_at	SOS1	AA700167	son of sevenless 同族体 1（ショウジョウバエ）
157	219010_at	FLJ10901	NM_018265	仮想蛋白質 FLJ10901
158	202121_s_at	BC-2	NM_014453	推定乳腺癌マーカー（32kD）
159	205109_s_at	ARHGEF4	NM_015320	Rho グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）4
160	209631_s_at	GPR37	U87460	G 蛋白質共役型受容体 37（エンドセリン受容体 B 型様）
161	212846_at	KIAA0179	AA811192	KIAA0179
162	213419_at	APBB2	U62325	アミロイドβ（A4）前駆体蛋白質結合、ファミリーB、メンバー2
163	210466_s_at	PAI-RBPI	BC002488	PAI-1 mRNA 結合蛋白質
164	201407_s_at	PPP1CB	AI186712	プロテインホスファターゼ 1、触媒サブユニット、βイソフォーム
165	218618_s_at	FAD104	NM_022763	脂肪細胞分化因子 104

【表５－６】

166	220533_at	FLJ13385	NM_024853	仮想蛋白質 FLJ13385
167	206364_at	KIF14	NM_014875	キネシンファミリーメンバー14
168	210886_x_at	TP53AP1	AB007457	TP53 活性化蛋白質 1
169	210319_x_at	MSX2	D89377	msh ホメオボックス同族体 2（ショウジョウバエ）
170	206565_x_at	SMA3	NM_006780	SMA3
171	221562_s_at	SIRT3	AF083108	サーチュイン（サイレント交配型情報調節 2 同族体）3（発芽酵母）
172	218489_s_at	ALAD	BC000977	アミノレブリン酸、デルタ-、脱水酵素
173	215723_s_at	PLD1	AJ276230	ホスホリパーゼ D1、ホスファチジルコリン特異的
174	212759_s_at	TCF7L2	AI703074	転写因子 7 様 2（T 細胞特異的、HMG-ボックス）
175	209173_at	AGR2	AF088867	アンテリアグラジエント 2 同族体（アフリカツメガエル）
176	201215_at	RAB26	NM_014353	RAB26、RAS 癌遺伝子ファミリーのメンバー
177	219562_at	PLS3	NM_005032	プラスチン 3（T イソフォーム）
178	209170_s_at	GPM6B	AI419030	糖蛋白質 M6B
179	209745_at	COQ7	AK024291	コエンザイム AQ7 同族体、ユビキノン（酵母）
180	211110_s_at	AR	AF162704	アンドロゲン受容体（ジヒドロテストステロン受容体；睾丸性女性化症）
181	212508_at	MOAP1	AK024029	アポトーシスの修飾因子 1
182	201012_at	ANXA1	NM_000700	アネキシン A1
183	204785_x_at	IFNAR2	L41944	インターフェロン（α、β、オメガ）受容体 2
184	218440_at	MCCC1	NM_020166	メチルクロトノイル-コエンザイム A カルボキシラーゼ 1（）
185	219861_at	FLJ10634	NM_018163	仮想蛋白質 FLJ10634
186	205429_s_at	MPP6	NM_016447	膜蛋白質、パルミトイル化 6（MAGUK p55 サブファミリーメンバー6）
187	217028_at	CXCR4	AJ224869	ケモカイン（C-X-C モチーフ）受容体 4
188	210687_at	CPT1A	BC000185	カルニチンパルミチン酸転移酵素 1A（肝臓）
189	202772_at	HMGCL	NM_000191	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-コエンザイム A リアーゼ
190	212442_s_at	LASS6	BG289001	LAG1 長寿保証同族体 6（発芽酵母）
191	220432_s_at	CYP39A1	NM_016593	シトクロム P450、ファミリー39、サブファミリーA、ポリペプチド 1
192	202146_at	IFRD1	AA747426	インターフェロン関連発生制御因子 1
193	200790_at	ODC1	NM_002539	オルニチンデカルボキシラーゼ 1
194	210648_x_at	SNX3	AB047360	ソーティングネキシン 3
195	205996_s_at	AK2	NM_013411	アデニル酸キナーゼ 2
196	212462_at	MYST4	AU144267	MYST ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（単球性白血病）4
197	214806_at	BICD1	U90030	双尾 D 同族体 1（ショウジョウバエ）

【００８７】

〔参照文献〕

REFERENCES

US Patent Nos: 5,445,934; 5,532,128; 5,556,752; 5,242,974; 5,384,261; 5,405,783; 5,412,087; 5,424,186; 5,429,807; 5,436,327; 5,472,672; 5,527,681; 5,529,756; 5,545,531; 5,554,501; 5,561,071; 5,571,639; 5,593,839; 5,599,695; 5,624,711; 5,658,734; 5,700,637; 6,004,755; 6,136,182; 6,218,114; 6,218,122; and 6,271,002

US patent publication: 20030194734

Akhurst et al. (2001) Trends Cell Biol. 11:S44-51.

Ammanamanchi et al. (2004) J Biol Chem 279:32620-5.

Binder et al. (1985) J Cell Biol. 101:1371-8.

Chen et al. (2005) J Biol Chem. 280:4632-4638

Eckert et al. (2004) Cancer Res. 64:4585-92.

Emmert-Buck et al. (1996) Science 274:998-1001.

Erlander et al. (2004) WO 2004/07014.

Fernando et al. (2004) Mol. Biol. Cell 15:3266-84.

Foekens et al. (1989) Cancer Res. 49:5823-8.

Fox et al. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun. 318:882-92.

Golub et al. (1999) "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring" Science 286:531-537

Gruvberger et al. (2001) Cancer Res. 61:5979-84.

Hall et al. (2001) J Biol Chem. 276:36869-72.

Kamme et al. (2004) Methods Mol. Med. 99:215-23.

Khoo et al. (1997) Protein Exp. Purif. 9:379-87.

Komuro et al. (2004) Oncogene 23:6914-23.

Luo et al. (1999) Nat. Med. 5:117-22.

Lutfalla et al. (1995) EMBO J. 14:5100-8.

Luzzi et al. (2003) J. Mol. Diagn. 5:9-14.

Ma et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:5974-9.

Malbert-Colas et al. (2003) Pflugers Arch. 447:35-43.

Mandlekar et al. (2001) Apoptosis 6:469-77.

Marinkovich et al. (1996) J Invest. Dermatol. 106:734-8.

Matsui et al. (2003) Anticancer Res. 23:195-200.

Moggs et al. (2001) EMBO Rep. 2:775-81.

Mokbel (2003) Curr. Med. Res. Opin. 19:683-8.

Nakamura et al. (2004) Oncogene 23:2385-400.

Nishidate et al. (2004) Int. J. Oncol. 25:797-819.

Parl (2000) "Estrogens, estrogen receptor and breast cancer" IOS Press/Ohmsha Amsterdam

Polacek et al. (2003) Physiol. Genomics 13:147-56.

Poliakov et al. (2004) Dev. Cell 7:465-80.

Ramaswamy et al. (2001) "Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures" Proc Natl Acad Sci USA 98:15149-15154

Seth et al. (2003) Anticancer Res. 23:2043-51.

Simstein et al. (2003) Exp. Biol. Med. 228:995-1003.

Sotiriou et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10393-8.

Spillantini et al. (1998) Trends Neurosci. 21:428-33.

Su et al. (2001) "Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures" Cancer Res 61:7388-7393

Sun et al. (2005) Exp. Cell Res. 302:96-107.

Tamimi et al. (2004) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45:3904-13.

van't Veer et al. (2002) "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer" Nature 415:530-536

West et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11462-7.

Wu et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:15192-200.

Wu et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:51673-84.

Yim et al. (2003) Toxicol. Pathol. 31:295-303.

【００８８】
〔実施の態様〕
（１）エストロゲン受容体の発現状態を決定する方法において、
ａ．　乳癌患者から腫瘍組織塊の試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルより高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、エストロゲン受容体の発現状態を示唆する、方法。
（２）エストロゲン受容体の発現状態を決定する方法において、
ａ．　乳癌患者から顕微鏡的に単離された腫瘍試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルより高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、エストロゲン受

容体の発現状態を示唆する、方法。
【００８９】
（３）乳癌患者の治療プロトコルを決定する方法において、
ａ．　乳癌患者から腫瘍組織塊の試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルより高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、再発を防止するために推奨された処置の程度および種類を医師が決定できるように再発のリスクを十分に示唆する、方法。
【００９０】
（４）乳癌患者の治療プロトコルを決定する方法において、
ａ．　乳癌患者から顕微鏡的に単離した腫瘍試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
を含み、
所定のカットオフレベルより高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、再発を防止するために推奨された処置の程度および種類を医師が決定できるように再発のリスクを十分に示唆する、方法。
（５）乳癌患者を処置する方法において、
ａ．　乳癌患者から腫瘍組織塊の試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表３に記載の配列番号に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、
ステップと、
ｃ．　前記患者がハイリスク患者である場合に、前記患者をアジュバント療法で処置するステップと、
を含む、方法。
【００９１】
（６）乳癌患者を処置する方法において、
ａ．　乳癌患者から顕微鏡的に単離した腫瘍試料を得るステップと、
ｂ．　ｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記試料での発現レベルを測定するステップであって、
前記ｍＲＮＡが、
ｉ．　表２もしくは表４に記載の配列番号に一致するか、または、
ｉｉ．　表２もしくは表４に記載の遺伝子配列に一致するｐｓｉｄからなる群から選択されるプローブセットによって認識される、

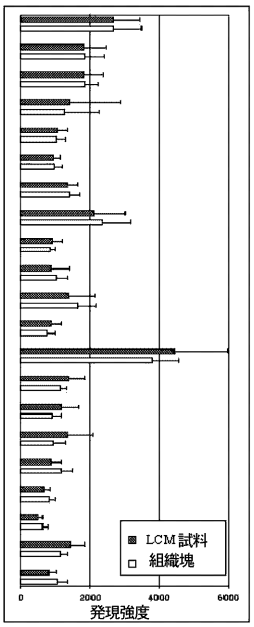
ステップと、
ｃ．　前記患者がハイリスク患者である場合に、前記患者をアジュバント療法で処置するステップと、
を含む、方法。
（７）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
前記試料が、原発腫瘍から得られる、方法。
（８）実施態様１、３、または５に記載の方法において、
前記組織塊の標本が、生検、または外科標本から得られる、方法。
（９）実施態様２、４、または６に記載の方法において、
前記顕微鏡による単離が、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによるものである、方法。
（１０）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
前記試料に構造的に発現している少なくとも１つの遺伝子の前記発現レベルを測定するステップ、
をさらに含む、方法。
（１１）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
特異性が、少なくともほぼ４０％である、方法。
【００９２】
（１２）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
感度が、少なくともほぼ９０％である、方法。
（１３）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
前記遺伝子の発現パターンが、再発患者を示唆する発現パターンと比較される、方法。
（１４）実施態様１３に記載の方法において、
前記発現パターンの前記比較が、パターン認識法で行われる、方法。
（１５）実施態様１４に記載の方法において、
前記パターン認識法が、コックスの比例ハザード解析の使用を含む、方法。
（１６）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
前記所定のカットオフレベルが、正常組織または良性細胞と比較して、前記試料で少なくとも１．５倍の過剰または過小発現である、方法。
（１７）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
前記所定のカットオフレベルが、正常組織または良性細胞と比較して、転移性の細胞を有する前記試料で、少なくとも統計学的に有意なｐ値の過剰または過小発現を有する、方法。
（１８）実施態様１７に記載の方法において、
前記ｐ値が、０．０５未満である、方法。
（１９）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
遺伝子発現が、マイクロアレイ、または遺伝子チップで測定される、方法。
【００９３】
（２０）実施態様１９に記載の方法において、
前記マイクロアレイが、ｃＤＮＡアレイ、またはオリゴヌクレオチドアレイである、方法。
（２１）実施態様２０に記載の方法において、
前記マイクロアレイまたは前記遺伝子チップが、１つ以上の内部コントロール試薬をさらに含む、方法。
（２２）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
遺伝子発現が、前記試料から抽出したＲＮＡのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって行われる核酸増幅法で決定される、方法。
（２３）実施態様２２に記載の方法において、
前記ＰＣＲが、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（ＲＴ－ＰＣＲ）である、方法。
（２４）実施態様２３に記載の方法において、

前記ＲＴ－ＰＣＲが、１つ以上の内部コントロール試薬をさらに含む、方法。
（２５）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
遺伝子発現が、前記遺伝子によってコードされる蛋白質を測定または検出することで検出される、方法。
（２６）実施態様２５に記載の方法において、
前記蛋白質が、前記蛋白質に特異的な抗体で検出される、方法。
（２７）実施態様１～６のいずれかに記載の方法において、
遺伝子発現が、前記遺伝子の特性を測定することでを検出される、方法。
【００９４】
（２８）実施態様２７に記載の方法において、
測定される前記特性が、ＤＮＡの増幅、メチル化、突然変異、および対立遺伝子変異からなる群から選択される、方法。
（２９）構成物において、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号からなる群から選択される少なくとも一つのプローブセット、
を含む、構成物。
（３０）生体試料のエストロゲン受容体の発現状態を決定するためにアッセイを行うためのキットにおいて、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、それらの相補体、またはその一部を検出するための物質、
を含む、キット。
（３１）実施態様３０に記載のキットにおいて、
前記配列番号が、表２および／または表３の配列番号である、キット。
（３２）実施態様３０に記載のキットにおいて、
前記配列番号が、表２および／または表４に記載されている、キット。
（３３）実施態様３０に記載のキットにおいて、
マイクロアレイ解析を行うための試薬、
をさらに含む、キット。
（３４）実施態様３０に記載のキットにおいて、
媒体であって、この媒体を通して、前記核酸配列、それらの相補体、またはその一部がアッセイされる、媒体、
をさらに含む、キット。
【００９５】
（３５）乳癌の状態を判断するための物品において、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、それらの相補体、またはその一部を検出するための物質、
を含む、物品。
（３６）実施態様３５に記載の物品において、
前記配列番号が、表２および／または表３の配列番号である、物品。
（３７）実施態様３５に記載の物品において、
前記配列番号が、表２および／または表４に記載されている、物品。
（３８）実施態様３５に記載の物品において、
マイクロアレイ解析を行うための試薬、
をさらに含む、物品。
（３９）実施態様３５に記載の物品において、
媒体であって、この媒体を通して、前記核酸配列、それらの相補体、またはその一部がアッセイされる、媒体、
をさらに含む、物品。

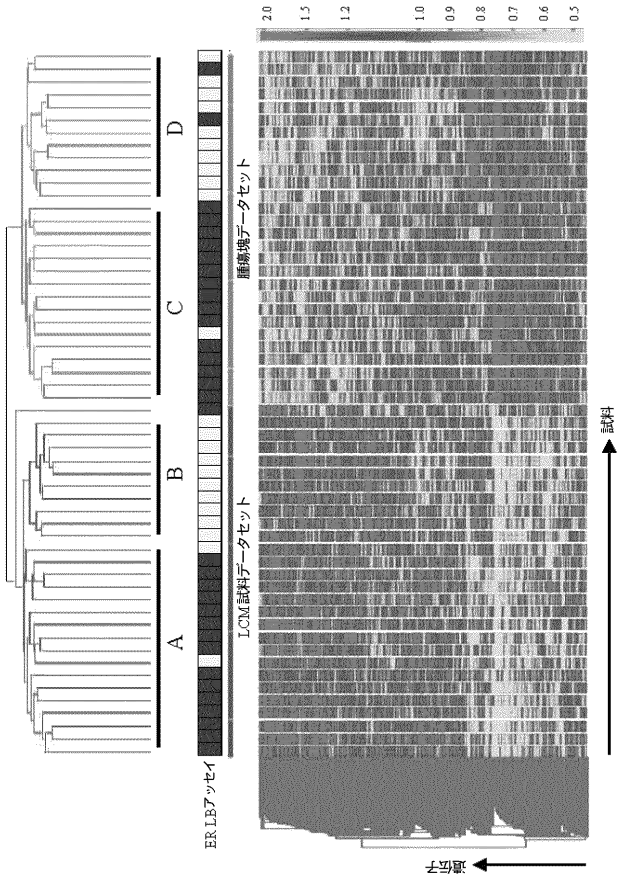
（４０）マイクロアレイ、または遺伝子チップにおいて、
実施態様１～６のいずれかに記載の方法を実施するための、マイクロアレイ、または遺伝子チップ。
（４１）実施態様４０に記載のマイクロアレイにおいて、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、その相補体、またはその一部、
を含む、マイクロアレイ。
（４２）実施態様４１に記載のマイクロアレイにおいて、
ｃＤＮＡアレイ、またはオリゴヌクレオチドアレイ、
を含む、マイクロアレイ。
【００９６】
（４３）実施態様４１に記載のマイクロアレイにおいて、
１つ以上の内部コントロール試薬、
をさらに含む、マイクロアレイ。
（４４）診断／予後診断のポートフォリオにおいて、
表２、表３、および／または表４に記載の配列番号に一致するｍＲＮＡをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組み合わせの、単離した核酸配列、その相補体、またはその一部、
を含む、ポートフォリオ。
【図面の簡単な説明】
【００９７】
【図１】腫瘍塊データセットとＬＣＭで得た試料データセットとの間で、２１の連続して発現したハウスキーピング遺伝子の発現強度を比較した図である。
【図２】ジーン・スプリング・ソフトウェア（Gene Spring software）を使用した、包括的遺伝子発現データの教師なし二次元階層型クラスタリング解析を示す図である。
【図３】ＥＲ＋サブグループとＥＲ－サブグループとの間で差動的に発現した遺伝子の遺伝子経路分析の図である。図３Ａは、以下の３つのカテゴリー、すなわち、ＬＣＭデータセットと腫瘍塊データセット両方に共通、ＬＣＭ試料データセットに特有、腫瘍塊データセットに特有、と命名した遺伝子数の円グラフを表す。図３Ｂは、共通の遺伝子リストで同定した経路を記載した図である。図３Ｃは、ＬＣＭデータセットに特有な遺伝子の有意な経路を示す。図３Ｄは、腫瘍塊データセットに特有の経路を表す。

【図１】

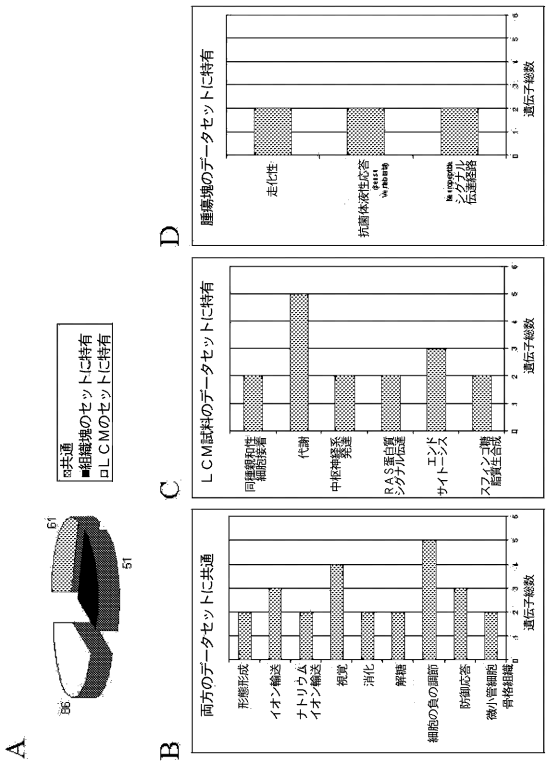
寄託番号	記号	p値	倍率変化
NM_012179	*FBXO7*	1.00	1.00
NM_014515	*CMOT2*	1.00	0.97
BC004917	*EVSR1*	1.00	0.98
NM_006923	*SDF2*	1.00	1.12
AK022697	*CEARA1*	1.00	1.04
NM_003584	*DUSP11*	1.00	0.95
NM_014260	*DNAJC8*	1.00	0.95
NM_000194	*HPRT1*	1.00	0.89
NM_016213	*TRIP4*	1.00	1.08
NM_015511	*C20orf4*	1.00	0.85
AL136935	*RIC-8*	1.00	0.84
NM_000190	*HMBS*	1.00	1.15
AI701949	*HNRPK*	0.95	1.17
AF112207	*EIF2B4*	0.60	1.21
AK022531	*DEDD*	0.59	1.30
AI075450	*KIAA0323*	0.34	1.44
NM_017703	*FBXL12*	0.09	0.75
NM_006413	*RPP38*	0.05	0.91
NM_018158	*SLC4A1AP*	0.03	0.79
NM_006565	*CTCF*	0.02	1.26
NM_005245	*FPF2RSD*	0.02	0.78



【図２】



【図３】


A
B
C
D
61
51
86
両方のデータセットに共通
LCM試料のデータセットに特有
腫瘍塊のデータセットに特有
遺伝子総数
形態形成
イオン輸送
ナトリウムイオン輸送
視覚
消化
解毒
細胞の負の調節
防御応答
微小管細胞骨格組織
同種細胞接着
代謝
中枢神経系発達
RAS蛋白質シグナル伝達
エンドサイトーシス
スフィンゴ糖脂質生合成
走化性
抗菌体液性応答
Ig receptor mediated signaling
Ig fold
Ig like
Ig like fold
Ig like subtype
Ig like C2 type
Ig like V type
Ig like V type
Ig like V

【配列表】
2008538284000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 37/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ｇ０１Ｎ 33/574	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04	
Ｇ０１Ｎ 37/00	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/574 Ａ	
		Ｇ０１Ｎ	37/00 １０２	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(71)出願人 308021338
レーンハルト・スーザン
ＬＥＨＮＨＡＲＤＴ， Ｓｕｓａｎ
アメリカ合衆国、０８９３３ ニュージャージー州、 ニュー・ブランズウィック、ワン・ジョンソン・アンド・ジョンソン・プラザ（番地なし）
Ｏｎｅ Ｊｏｈｎｓｏｎ ＆ Ｊｏｈｎｓｏｎ Ｐｌａｚａ, Ｎｅｗ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ, ＮＪ ０８９３３, Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ
(71)出願人 308021349
ユー・ジャック
ＹＵ， Ｊａｃｋ
アメリカ合衆国、９２１３１ カリフォルニア州、サン・ディエゴ、アフィニティ・コート １１２３５、ナンバー ６４
１１２３５ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｃｏｕｒｔ ＃ ６４， Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ, ＣＡ ９２１３１, Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ
(71)出願人 308021350
ジャン・ユチウ
ＪＩＡＮＧ， Ｙｕｑｉｕ
アメリカ合衆国、９２１３０ カリフォルニア州、サン・ディエゴ、マーカー・ロード ７６２０
７６２０ Ｍａｒｋｅｒ Ｒｏａｄ, Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ, ＣＡ ９２１３０, Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ
(71)出願人 308021361
ヤン・フェイ
ＹＡＮＧ， Ｆｅｉ
アメリカ合衆国、９７４０３ オレゴン州、ユージーン、ムーン・マウンテン・ドライブ ２６４７
２６４７ Ｍｏｏｎ Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｄｒｉｖｅ， Ｅｕｇｅｎｅ, ＯＲ ９７４０３, Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ
(74)代理人 100088605
弁理士 加藤 公延
(74)代理人 100123434
弁理士 田澤 英昭
(74)代理人 100101133
弁理士 濱田 初音
(72)発明者 ワン・イーシン
アメリカ合衆国、９２１３０ カリフォルニア州、サン・ディエゴ、エル・カミノ・リアル １２

５１１、ユニット・イー
(72)発明者　ユー・ジャック
アメリカ合衆国、９２１３１　カリフォルニア州、サン・ディエゴ、アフィニティ・コート　１１２３５、ナンバー　６４
(72)発明者　ジャン・ユチウ
アメリカ合衆国、９２１３０　カリフォルニア州、サン・ディエゴ、マーカー・ロード　７６２０
(72)発明者　ヤン・フェイ
アメリカ合衆国、９７４０３　オレゴン州、ユージーン、ムーン・マウンテン・ドライブ　２６４７

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA80 CA04 CA09 HA12
4B029 AA07 BB20 CC08 FA15
4B063 QA19 QQ43 QR32 QR55 QS16 QS25 QS34 QX02
4C085 AA32 AA38 DD86